



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

**EPIDEMIOLOGIA MOLECULAR E CARACTERIZAÇÃO DA RESISTÊNCIA DE
AMOSTRAS DE *Acinetobacter baumannii* e *Pseudomonas aeruginosa*
RESISTENTES AOS CARBAPENÊMICOS PROVENIENTES DE
HOSPITAIS DA GRANDE VITÓRIA-ES**

THALITA PEREIRA CABRAL VALLORINI

**VITÓRIA
2017**



THALITA PEREIRA CABRAL VALLORINI

**EPIDEMIOLOGIA MOLECULAR E CARACTERIZAÇÃO DA RESISTÊNCIA DE
AMOSTRAS DE *Acinetobacter baumannii* e *Pseudomonas aeruginosa*
RESISTENTES AOS CARBAPENÊMICOS PROVENIENTES DE
HOSPITAIS DA GRANDE VITÓRIA-ES**

Dissertação apresentada à
Universidade Federal do Espírito
Santo como requisito parcial para
a obtenção do título de Mestre do
Programa de Pós-graduação em
Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Ricardo Pinto Schuenck

**VITÓRIA
2017**

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao meu maior amigo de todos, Jesus, pois me inspira a ser um ser humano melhor a cada dia, a amar, a valorizar as pequenas coisas e a ter humildade. Te agradeço por me ensinar que os seus sonhos são bem mais importantes que o meu, pois enquanto me preocupo apenas com minha vida, você se preocupa com toda a humanidade. Obrigada por me ensinar que todas as coisas aqui são passageiras, que tudo morre e perece, e que o que realmente importa é invisível aos olhos. Obrigada Senhor por me amar como eu sou, por ser meu abrigo seguro, meu Pai e companheiro.

Agradeço à minha família, que sempre se preocupou em ver o sorriso em meu rosto, que me ajudou sempre que precisei e por todo amor e carinho dedicados a mim. Em especial agradeço à minha mãe, ao meu pai (apesar de não estar aqui mais) e à minha irmã por simplesmente ser quem vocês são e, mesmo que não tivesse nenhum diploma, ainda os agradeceria.

Agradeço ao meu noivo pelo cuidado, pelo amor e companheirismo, por compartilhar de dias alegres e dias difíceis, pelas palavras, conselhos e pela amizade constante.

Aos meus amigos irmãos que me ajudaram em cada momento que passei, pelas conversas e momentos juntos. Obrigada por fazerem parte de quem sou.

Aos colegas do LabCAS e RESBAC por dois anos de ajuda, ensinamentos, conversas e brincadeiras. Guardo cada um em meu coração com carinho.

Ao professor Ricardo Pinto Schuenck por me orientar academicamente durante esse período, pelos ensinamentos, paciência e ajuda com o projeto de pesquisa desenvolvido.

Aos funcionários da Microbiologia pela ajuda e carinho. Aos funcionários e professores do programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas - UFES pelo ensino e ajuda durante esse processo.

Às agências financiadoras, que permitiram que esse projeto fosse realizado: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e Fundação de Amparo à Pesquisa do Espírito Santo (FAPES)

Ao Laboratório Central de Saúde Pública do Espírito Santo (LACEN-SESA) pela parceria no fornecimento das amostras bacterianas.

“Não existe verdadeira inteligência sem bondade.”

Ludwig Van Beethoven

RESUMO

A emergência e a disseminação da resistência aos antimicrobianos entre os bacilos Gram-negativos não fermentadores, tais como *Acinetobacter baumannii* e *Pseudomonas aeruginosa*, são um problema mundial. Carbapenêmicos são antimicrobianos beta-lactâmicos indicados para o tratamento de infecções graves causadas por esses agentes, contudo, o surgimento de patógenos multirresistentes ameaça seriamente o uso dessa classe de fármaco no ambiente hospitalar. O presente trabalho teve como objetivo caracterizar amostras clínicas de *P. aeruginosa* e *A. baumannii* resistentes aos carbapenêmicos, quanto a presença de genes de resistência aos beta-lactâmicos, perfil epidemiológico e de suscetibilidade aos antimicrobianos utilizados na rotina clínica. Para avaliar a suscetibilidade das amostras aos antimicrobianos foi realizado o método de difusão em ágar a partir do disco e para a determinação da concentração inibitória mínima foi realizado o método do teste de gradiente do antimicrobiano. A pesquisa dos genes codificadores de beta-lactamases foi feita através da técnica de PCR e o polimorfismo genético foi analisado pelas técnicas de eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE) e tipagem de sequência de multilocus (MLST). As espécies incluídas no estudo foram: *A. baumannii* (n=26) e *P. aeruginosa* (n=15). A maioria das amostras apresentou um perfil de multirresistência aos antimicrobianos testados, destacando-se a resistência à colistina em nove amostras de *A. baumannii*. Nessa espécie, o gene de carbapenemase prevalente (92,3%) foi o *bla_{OXA-23}* e nas amostras de *P. aeruginosa* o gene *bla_{VIM}* mostrou-se prevalente (33,3%). Através da análise por PFGE, foi observado a prevalência de dois pulsotipos entre as amostras de *A. baumannii*: abA (34,6%) e abB (23%) enquanto que as amostras de *P. aeruginosa* apresentaram pulsotipos distintos, demonstrando a origem policlonal das amostras. Através do MLST realizado em cinco amostras de *P. aeruginosa*, foram encontrados os STs 357, 2321, 1121, 244 e 227, sendo observados dois complexos clonais de importância mundial o CC235 e o CC244. Adicionalmente, os ST357, ST2321 e ST1121 foram descritos pela primeira vez no Brasil.

Palavras-chave: *Acinetobacter baumannii*. *Pseudomonas aeruginosa*. Beta-lactamases. Resistência. Genotipagem.

ABSTRACT

The emergence and spread of antimicrobial resistance among non-fermenting Gram-negative bacilli, such as *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas aeruginosa*, is a worldwide problem. Carbapenems are beta-lactam antimicrobials indicated for the treatment of serious infections caused by these agents, however, the emergence of multiresistant pathogens seriously threatens the use of this class of drug in the hospital environment. The present work aimed to characterize clinical samples of *P. aeruginosa* and *A. baumannii* resistant to carbapenems, as well as the presence of beta-lactam resistance genes, epidemiological profile and susceptibility to antimicrobials used in clinical routine. The antimicrobial susceptibility was performed by disc diffusion and antimicrobial gradient tests. PCR was used to the detection of beta-lactamases-encoding genes and the genetic polymorphism was analyzed by pulsed field gel electrophoresis (PFGE) and multilocus sequence typing (MLST) techniques. The species included in this study were: *A. baumannii* (n = 26) and *P. aeruginosa* (n = 15). The most of the isolates presented a multiresistance profile to the tested antimicrobials, highlighting the resistance to colistin in nine isolates of *A. baumannii*. Among the *A. baumannii* isolates, the prevalent carbapenemase gene (92.3%) was *bla_{OXA-23}* and in *P. aeruginosa* isolates the *bla_{VIM}* gene was prevalent (33.3%). The PFGE analysis showed the prevalence of two pulsotypes among the *A. baumannii*: abA (34.6%) and abB (23%), while the *P. aeruginosa* isolates presented distinct pulsotypes, demonstrating the polyclonal origin of isolates. MLST was performed in five isolates of *P. aeruginosa* presenting different pulsotypes and STs 357, 2321, 1121, 244 and 227 were found, with two clonal complexes of world importance: CC235 and CC244. In addition, ST357, ST2321 and ST1121 were described for the first time in Brazil.

Key words: *Acinetobacter baumannii*. *Pseudomonas aeruginosa*. Beta-lactamases. Resistance. Genotyping.

LISTA DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura 1: <i>Acinetobacter baumannii</i> observado em: A: cultura em ágar sangue; B: coloração de Gram visualizada em microscopia óptica; C: microscopia eletrônica de varredura..... | 6 |
| Figura 2: <i>Pseudomonas aeruginosa</i> observada em A: semeadura em ágar nutriente; B: Coloração de Gram visualizada em microscopia óptica; C: Microscopia eletrônica de transmissão..... | 8 |
| Figura 3: Estrutura química das quatro classes de beta-lactâmicos..... | 11 |
| Figura 4: Estrutura química das moléculas de carbapenêmicos..... | 13 |
| Figura 5: Porcentagens dos fenótipos de resistência entre os bacilos Gram-negativos mais frequentemente notificados como agentes etiológicos de IPCSL associada a CVC em pacientes adultos hospitalizados em UTIs..... | 20 |
| Figura 6: Perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos das 26 amostras de <i>Acinetobacter baumannii</i> | 38 |
| Figura 7: Perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos das 15 amostras de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | 39 |
| Figura 8: Imagem representativa do teste de difusão em ágar a partir do disco de uma amostra de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | 40 |
| Figura 9: Presença dos genes codificadores de beta-lactamases nas 26 amostras de <i>Acinetobacter baumannii</i> | 42 |
| Figura 10: Presença dos genes codificadores de beta-lactamases nas 15 amostras de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | 43 |
| Figura 11: Foto representativa dos produtos de PCR para identificação dos genes codificadores de beta-lactamases..... | 45 |
| Figura 12: Pulsotipos das amostras de <i>Acinetobacter baumannii</i> obtidos por meio da análise do padrão de fragmentação do DNA cromossomal e separação por eletroforese de campo pulsado (PFGE)..... | 46 |
| Figura 13: Foto representativa da eletroforese de campo pulsado (PFGE) evidenciando os padrões de fragmentação do DNA cromossômico das amostras de <i>Acinetobacter baumannii</i> | 46 |
| Figura 14: Pulsotipos das amostras de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> obtidos por meio da análise do padrão de fragmentação do DNA cromossomal e separação por eletroforese de campo pulsado (PFGE)..... | 47 |
| Figura 15: Foto representativa da eletroforese de campo pulsado (PFGE) evidenciando os padrões de fragmentação do DNA cromossômico das amostras de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | 47 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|--|----|
| Tabela 1: Classificação dos antimicrobianos mais comumente utilizados na prática clínica para tratamento de infecções bacterianas..... | 10 |
| Tabela 2: Classificação das beta-lactamases..... | 16 |
| Tabela 3: Amostras bacterianas utilizadas no estudo, suas respectivas fontes de isolamento e local de origem..... | 28 |
| Tabela 4: Pontos de corte estabelecidos pelo BrCAST (2017) para os antimicrobianos testados..... | 30 |
| Tabela 5: Sequência dos iniciadores, temperatura de anelamento e tamanho dos produtos das reações em cadeia da polimerase para a detecção dos genes de beta-lactamases..... | 32 |
| Tabela 6: Condições específicas para a detecção dos genes utilizados nas reações de PCR multiplex e simples..... | 33 |
| Tabela 7: Oligonucleotídeos iniciadores específicos e genes alvos utilizados para realização das reações de PCR da técnica de <i>multilocus sequence typing</i> de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | 36 |
| Tabela 8: Oligonucleotídeos iniciadores utilizados para o sequenciamento da técnica de <i>multilocus sequence typing</i> de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | 37 |
| Tabela 9. Concentrações inibitórias mínimas (CIM) dos antimicrobianos nas 15 amostras de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> analisadas neste estudo..... | 41 |
| Tabela 10: Concentrações inibitórias mínimas (CIM) dos antimicrobianos nas 26 amostras de <i>Acinetobacter baumannii</i> analisadas neste estudo..... | 41 |
| Tabela 11: Perfil da presença dos genes codificadores de beta-lactamases encontrados nas 26 amostras de <i>Acinetobacter baumannii</i> | 43 |
| Tabela 12: Perfil da presença dos genes codificadores de beta-lactamases encontrados nas 15 amostras de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | 44 |
| Tabela 13: Pulsotipo, subtipo, ST e perfil alélico das amostras de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | 48 |
| Tabela 14: Relação entre os pulsotipos e subtipos de <i>Acinetobacter baumannii</i> detectados e a presença dos genes codificadores de beta-lactamases..... | 50 |
| Tabela 15: Relação entre os pulsotipos e subtipos de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> detectados e a presença dos genes codificadores de beta-lactamases..... | 51 |

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

AMI - Amicacina

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária

BGN - Bacilos Gram-negativo

BGN - NF- Bacilos Gram-negativo Não Fermentadores

BHI - Ágar de infusão de cérebro-coração (do inglês *brain heart infusion agar*)

BrCAST - Comitê Brasileiro de Análise de Susceptibilidade Antimicrobiana (do inglês *Brazilian Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*)

CAZ - Ceftazidima

CC - Complexo clonal

CIP - Ciprofloxacina

CIM - Concentração inibitória mínima

CLSI - Instituto de Normas Laboratoriais e Clínicas (do inglês *Clinical and Laboratory Standards Institute*)

CPM - Cefepima

CTX-M - Beta-lactamase cefotaximase

CVC - Catéter venoso central

DNA - ácido desoxirribonucléico

EDTA - Ácido etilenodiaminotetracético (do inglês *ethylene diamine tetracetic acid*)

ERT - Ertapenem

ESBL - Beta-Lactamases de Espectro Estendido (do inglês *extended-spectrum betalactamases*)

GEN - Gentamicina

GES - do inglês *Guiana extended spectrum beta-lactamase*

HCl - Ácido clorídrico

IMP - do inglês *Pseudomonas imipenem resistant*

Imp - imipenem

IPCSL - Infecções primárias da corrente sanguínea confirmadas em laboratório

IRAS - Infecções relacionadas à assistência à saúde

KPC - *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase

LACEN - Laboratório Central de Saúde Pública do Espírito Santo

LEV - Levofloxacina

LPS - Lipopolissacarídeo

MDR - Resistência à múltiplas drogas (do inglês *multidrug resistance*)

MgCl₂ - Cloreto de Magnésio

MLST - Tipagem de sequência de multilocus (do inglês *multilocus sequence typing*)

MPM - Meropenem

MS - Ministério da Saúde

NaCl - Cloreto de sódio

NDM - do inglês *New Delhi Metallo-beta-lactamase*

OXA - Oxacilinase

pb - Pares de bases

PBP - Proteína ligante de penicilina (do inglês *penicillin binding protein*)

PCR - Reação em cadeia da polimerase (do inglês *polymerase chain reaction*)

PFGE - Eletroforese em campo pulsado (do inglês *pulsed field gel electrophoresis*)

pH - Potencial de hidrogênio

PIT - Piperacilina-tazobactam

RNA - Ácido ribonucleico

rpm - Rotações por minuto

SDS - Dodecil sulfato de sódio

SPM- São Paulo metallo-beta-lactamase

ST - Tipo de sequência (do inglês *sequence type*)

SUS - Sistema Único de Saúde

SUT - Trimetoprima-sulfametoxazol

TAC - Ticarcilina-clavulanato

TBE - Tampão Tris-borato EDTA

TE - Tampão Tris-EDTA

TEM - Beta-lactamase Temoneira

TOB - Tobramicina

Tris - Tris (hidroximetil) aminometano

TSB - Caldo de soja triptona (do inglês *triptone soya broth*)

UFES - Universidade Federal do Espírito Santo

UTI - Unidade de terapia intensiva

UTIN - Unidade de terapia intensiva neonatal

VIM - do inglês *metallo-beta-lactamase encoded by integron Verona*

SUMÁRIO

| | |
|---|----|
| 1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA..... | 1 |
| 2 REVISÃO DA LITERATURA..... | 3 |
| 2.1 INFECÇÕES RELACIONADAS À ASSISTÊNCIA À SAÚDE (IRAS)..... | 3 |
| 2.2 BACIOS GRAM-NEGATIVOS NÃO FERMENTADORES (BGN-NF)..... | 4 |
| 2.2.1 <i>Acinetobacter baumannii</i> | 5 |
| 2.2.2 <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | 7 |
| 2.3 ANTIMICROBIANOS CARBAPENÊMICOS..... | 9 |
| 2.4 RESISTÊNCIA BACTERIANA AOS BETA-LACTÂMICOS..... | 14 |
| 2.4.1 Beta-lactamases..... | 14 |
| 2.4.2 Resistência a carbapenêmicos em <i>Acinetobacter baumannii</i> e <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | 18 |
| 2.5 EPIDEMIOLOGIA DE <i>Acinetobacter baumannii</i> e <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | 22 |
| 3 OBJETIVO GERAL..... | 27 |
| 3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS..... | 27 |
| 4 MATERIAIS E MÉTODOS..... | 28 |
| 4.1 AMOSTRAS BACTERIANAS..... | 28 |
| 4.2 DETERMINAÇÃO DO PERFIL DE SUSCEPTIBILIDADE AOS ANTIMICROBIANOS..... | 28 |
| 4.3 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM)..... | 30 |
| 4.4 PESQUISA DOS GENES CODIFICADORES DE BETA-LACTAMASES ATRAVÉS DA TÉCNICA DE REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR)..... | 31 |
| 4.5 ANÁLISE DO POLIMORFISMO GENÉTICO ATRAVÉS DA FRAGMENTAÇÃO DO DNA GENÔMICO E ELETROFORESE EM GEL DE CAMPO PULSADO (PFGE)..... | 34 |
| 4.6 ANÁLISE DO POLIMORFISMO GENÉTICO ATRAVÉS DE <i>MULTILOCUS SEQUENCE TYPING</i> (MLST)..... | 35 |
| 4.6.1 Amplificação por PCR..... | 35 |

| | |
|--|----|
| 4.6.2 Sequenciamento..... | 37 |
| 5 RESULTADOS | 38 |
| 5.1 PERFIL DE SUSCEPTIBILIDADE AOS ANTIMICROBIANOS..... | 38 |
| 5.1.1 <i>Acinetobacter baumannii</i> | 38 |
| 5.1.2 <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | 39 |
| 5.2 AVALIAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM) DAS AMOSTRAS DE <i>Pseudomonas aeruginosa</i> e <i>Acinetobacter baumannii</i> | 40 |
| 5.3 PESQUISA DOS GENES CODIFICADORES DE BETA-LACTAMASES ATRAVÉS DA TÉCNICA DE REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR)..... | 41 |
| 5.4 ANÁLISE DO POLIMORFISMO GENÉTICO ATRAVÉS DA FRAGMENTAÇÃO DO DNA GENÔMICO E ELETROFORESE EM GEL DE CAMPO PULSADO (PFGE)..... | 44 |
| 5.5 TIPAGEM MOLECULAR ATRAVÉS DO MULTILOCUS SEQUENCE TYPING (MLST)..... | 48 |
| 5.6 RELAÇÃO ENTRE OS PULSOTIPOS E SUBTIPOS DE <i>Pseudomonas aeruginosa</i> e <i>Acinetobacter baumannii</i> DETECTADOS E A PRESENÇA DOS GENES CODIFICADORES DE BETA-LACTAMASES..... | 49 |
| 6 DISCUSSÃO..... | 52 |
| 7 CONCLUSÕES..... | 59 |
| 8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... | 61 |

1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

As infecções relacionadas à assistência a saúde (IRAS) são consideradas um problema de saúde pública, causando impacto na morbi-mortalidade, no tempo de internação e nos custos com procedimentos diagnósticos e terapêuticos, além de influenciar nas relações emocionais e socioeconômicas dos pacientes, da família e da comunidade (Oliveira et al., 2010). O número de infecções hospitalares permanece elevado no Brasil e o custo de um paciente com infecção pode ser três vezes maior do que o de um paciente sem a mesma (Menezes et al., 2007; Moura et al., 2007).

Nas unidades de terapia intensiva (UTIs), as IRAS são consideradas mais graves, pois nestes locais são atendidos pacientes com complicações e dependentes de aparelhos de suporte mais complexos. A ocorrência de IRAS em UTIs está associada, principalmente, à gravidade clínica dos pacientes, à realização de procedimentos invasivos, como uso de cateter venoso central, ventilação assistida e também ao ambiente, que favorece a seleção natural de micro-organismos, devido ao uso constante de antimicrobianos (Wagenlehner et al., 2006; Lima et al., 2007).

Entre os principais agentes de IRAS estão os bacilos Gram-negativos não fermentadores (BGN-NF), destacadamente, *Pseudomonas aeruginosa* e *Acinetobacter baumannii*. Esses micro-organismos são uma importante causa de infecções graves no ambiente hospitalar, afetando principalmente pacientes imunocomprometidos e aqueles submetidos a tratamentos cirúrgicos. Muitas espécies recebem maior atenção por sua resistência a múltiplos antimicrobianos e pela facilidade com que elas podem adquirir novos mecanismos de resistência, sendo estes fatores responsáveis por facilitar a sua proliferação em hospitais (Enoch, Birkett, Ludlam, 2007).

Um dos avanços mais importantes na medicina foi a descoberta e o uso de antimicrobianos na prática clínica, que proporcionou o tratamento de variados tipos de doenças infecciosas. Contudo, desde o início do uso do primeiro antimicrobiano, já começaram a ser descritas a ocorrência de resistência bacteriana a estes medicamentos e, atualmente, uma grande variedade de micro-

organismos, de origem hospitalar e comunitária, vêm apresentando resistência a muitos antimicrobianos (Powers, 2004).

Segundo Livermore, “a resistência bacteriana pode ser definida como um conjunto de mecanismos de adaptação desses micro-organismos contra os efeitos nocivos ou letais aos quais estão sendo expostos” (Livermore, 1995). A produção de enzimas beta-lactamases é um dos principais mecanismos de adaptação, sendo muito eficaz em diversos casos. Essas enzimas catalisam a hidrólise do anel beta-lactâmico dos antimicrobianos e assim o mesmo fica inativado e, conseqüentemente, impedido de atuar nas enzimas responsáveis pela síntese da parede celular bacteriana (Bush, 1988; Rossolini, 2005). Os antimicrobianos beta-lactâmicos são os mais utilizados para o tratamento das infecções no ambiente hospitalar, sendo composto por quatro grupos: penicilinas, cefalosporinas, monobactâmicos e carbapenêmicos (Murray et al., 2004).

A resistência aos carbapenêmicos e a produção de beta-lactamases em BGN-NF têm se tornado um problema muito relevante em todo o mundo. As infecções por esses micro-organismos representam um desafio em termos de terapia e controle nas instituições hospitalares.

Tendo em vista a importância desses micro-organismos na assistência à saúde, a limitação da terapia antimicrobiana efetiva, o alto potencial de transferência de resistência e sua elevada capacidade de disseminação cruzada, por contato direto e indireto, se torna essencial a elucidação de aspectos clínicos e epidemiológicos das infecções causadas por esses agentes. Dessa forma será possível gerar o desenvolvimento de estratégias de controle e prevenção das mesmas, e também, estudar abordagens terapêuticas mais eficazes para prevenir e controlar futuros surtos, além de propor medidas específicas para prevenir a aquisição e disseminação desses patógenos.

Neste sentido, em termos de saúde coletiva e do desenvolvimento do conhecimento científico e tecnológico, é imprescindível que a comunidade conheça o panorama atual das IRAS, bem como o perfil fenotípico e genotípico das amostras causadoras de infecções em sua região. É nesse contexto que o presente estudo visa caracterizar a resistência e epidemiologia de amostras de *A. baumannii* e *P. aeruginosa* resistentes aos carbapenêmicos associadas a infecções nos hospitais da Grande Vitória, Espírito Santo. Tendo em vista que

ainda não existem dados detalhados sobre estes micro-organismos em nossa região, o presente estudo mostra-se pioneiro nessa área, além de poder contribuir para o controle de infecção nas Instituições pesquisadas.

O presente trabalho é parte de um estudo mais abrangente, desenvolvido no Laboratório de Biologia Molecular e Virulência Bacteriana do Departamento de Patologia da UFES, envolvendo relevantes grupos de bactérias multirresistentes isoladas de diferentes hospitais, intitulado “Epidemiologia molecular e investigação de genes de resistência em bactérias multirresistentes isoladas em hospitais da Grande Vitória” com apoio do CNPq/FAPES (Edital 10/2013 – CNPq/MS-DECIT/SESA - processo 65841328).

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 INFECÇÕES RELACIONADAS À ASSISTÊNCIA À SAÚDE (IRAS)

As IRAS são as mais frequentes e importantes complicações ocorridas em pacientes hospitalizados (Barros et al., 2012; Moura et al., 2007). O Ministério da Saúde (MS), na Portaria nº 2.616 de 12/05/1998, define IRAS como infecções adquiridas após a admissão do paciente na unidade hospitalar e que se manifestam durante a internação ou após a alta, quando puder ser relacionada com a internação ou procedimentos hospitalares (Ministério da Saúde, 1998). Esse problema pode contribuir para o aumento da morbidade, da letalidade, do tempo de internação, e além disso, representa uma ameaça constante à disseminação de bactérias resistentes aos antimicrobianos (Garcia et al., 2013).

Segundo um levantamento bibliográfico realizado por Barros e colaboradores, aproximadamente 720.000 pessoas adquirem infecção hospitalar por ano no Brasil, sendo que 20% destas vão a óbito. As IRAS aumentam o tempo de internação, em média, de 5 a 10 dias e também aumentam o custo neste período, pois ocorrem mais gastos devido a exames e medicamentos, sendo esse custo cerca de três vezes maior do que o custo com um paciente sem infecção (Barros et al., 2012). Além disso, deve-se dar importância as

consequências que este problema traz para o paciente, para sua família e para a comunidade em geral, tal como o afastamento da vida social e do trabalho, com consequente comprometimento social, psicológico e econômico (Garcia et al., 2013).

Nos últimos anos, a incidência de IRAS associadas a micro-organismos resistentes têm aumentado em todo o mundo (Garcia et al., 2013), sendo que os principais microrganismos responsáveis pelas infecções hospitalares são: *Staphylococcus aureus*, *Acinetobacter* spp., *Enterobacter* spp., *Pseudomonas* spp., *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Serratia marcescens* (Barros et al., 2012). Também é observado, o aumento na ocorrência de infecções por *Acinetobacter* spp. e *Pseudomonas* spp. resistentes às cefalosporinas, carbapenêmicos, quinolonas e aminoglicosídeos (Martins, 2006).

De acordo com um trabalho de vigilância epidemiológica realizado por Gales e colaboradores (2012) envolvendo quatro centros médicos do Brasil, dois da Argentina, dois do Chile e dois do México, no período de 2008 a 2010, *P. aeruginosa* foi o principal bacilo Gram-negativo (BGN) causador de pneumonia (31,2%) e em infecções de feridas cirúrgicas. No geral, *E. coli*, *P. aeruginosa* e *Klebsiella* spp. foram os principais micro-organismos isolados. O estudo ainda mostrou que o Brasil foi o país com maior taxa de BGNs multirresistentes (40,9%), sendo que os isolados de *P. aeruginosa* e *A. baumannii* mostraram-se resistentes a quase todos os antimicrobianos testados, exceto à colistina (Gales et al., 2012).

Lima e colaboradores relataram que os dados sobre IRAS no Brasil são pouco divulgados, sendo de grande importância que cada instituição defina sua situação epidemiológica em termos do conhecimento da microbiota hospitalar e da frequência de ocorrência de infecções (Lima et al., 2007).

2.2 BACILOS GRAM-NEGATIVOS NÃO FERMENTADORES (BGN-NF)

Bacilos Gram-negativos não fermentadores (BGN-NF) são micro-organismos aeróbios e incapazes de utilizar carboidratos como fonte de energia através da fermentação, degradando-os pela via oxidativa. A maioria é oxidase positiva e móvel. Possuem como habitat natural o meio ambiente, podendo ser encontrados em: água; solo; peixes congelados; leite cru; soluções desinfetantes

etc. As amostras provenientes de meio ambiente hospitalar de onde são mais frequentemente isolados são: água de torneira; respiradores; cateteres de sucção; antissépticos; soros e outros (McGowan, 2006).

Estes micro-organismos são importante causa de infecções graves na prática hospitalar, afetando, principalmente, pacientes imunocomprometidos e aqueles submetidos a tratamentos cirúrgicos. Muitas espécies são importantes por sua resistência a múltiplos antimicrobianos e pela facilidade com que elas podem adquirir novos mecanismos de resistência, sendo estes fatores responsáveis por facilitar a sua proliferação em hospitais (Enoch, Birkett, Ludlam, 2007).

Entre os principais patógenos BGN-NF relacionados com infecção hospitalar estão: *Pseudomonas aeruginosa* e *Acinetobacter baumannii* (Enoch, Birkett, Ludlam, 2007).

2.2.1 *Acinetobacter baumannii*

O gênero *Acinetobacter* pertence à família *Moraxellaceae*, sendo esta pertencente à ordem *Pseudomonales* (<http://www.bacterio.net/-classificationac.html#Acinetobacter>). Esse gênero é composto por cocobacilos Gram-negativos (Figura 1), aeróbios estritos, não fermentadores de glicose, imóveis, produtores de catalase e que não apresentam a enzima citocromo C oxidase. Espécies do gênero *Acinetobacter* apresentam bom crescimento em meio sólido, rotineiramente utilizados em laboratórios de microbiologia clínica, como ágar sangue de carneiro ou TSA (*triple soy agar*), quando incubados a 37°C por 18 a 24 horas (Peleg, Seifert, Paterson, 2008; Towner, 1996).

Atualmente, o gênero *Acinetobacter* é composto por 55 espécies (LPSN, 2017 - <http://www.bacterio.net/acinetobacter.html>) sendo que quatro, *A. calcoaceticus*, *A. baumannii*, *A. pittii* e *A. nosocomialis* são intimamente relacionadas, sendo difícil de distinguir uma das outras por características fenotípicas. Deste modo, em 1992 foi proposto o agrupamento dessas espécies no complexo *Acinetobacter calcoaceticus-Acinetobacter baumannii* (Gerner-Smidt, 1992; Nemec et al., 2011), sendo o *Acinetobacter baumannii* a principal espécie associada a surtos em ambiente hospitalar. Essa espécie é responsável por 10%

de todas as infecções hospitalares entre os micro-organismos Gram-negativos e é classificado pela Sociedade Americana de Doenças Infecciosas (*Infectious Diseases Society of America*) como um dos seis mais importantes micro-organismos resistentes a múltiplos fármacos (MDR) em hospitais de todo o mundo (Towner, 1996; Joly Guillou, 2005; Talbot et al., 2006).

Estes organismos formam colônias brancas acinzentadas (Figura 1), por vezes levemente mucóide, com um diâmetro de colônias de 1,5 a 3 mm. As colônias do complexo *A. calcoaceticus*-*A. baumannii* se assemelham as de *Enterobacteriaceae*, enquanto a maior parte das outras espécies de *Acinetobacter* produz colônias menores e mais translúcidas (Peleg et al., 2008). *A. baumannii* tem requisitos de crescimento simples explorando uma variedade de fontes de alimentação e é adaptável a diferentes temperatura, pH, salinidade e níveis de umidade (Iacono et al., 2008).

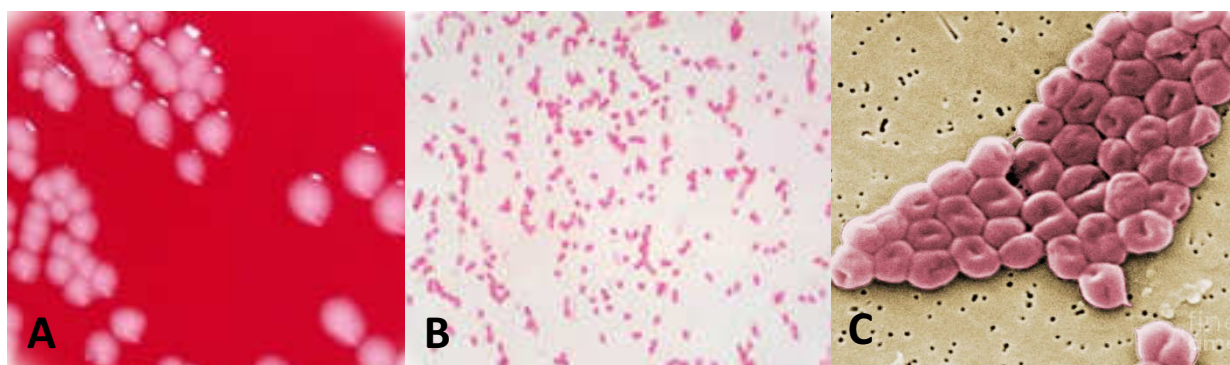


Figura 1: *Acinetobacter baumannii* observada em: A: cultura em ágar sangue; B: coloração de Gram visualizada em microscopia óptica; C: microscopia eletrônica de varredura. Fonte: www.cdc.gov.

Acinetobacter baumannii é persistente no ambiente hospitalar e apresenta capacidade de causar uma variedade de infecções oportunistas (Loehfelm, Luke, & Campagnari, 2008; Loehfelm et al., 2008), incluindo infecções no trato respiratório, urinário, meningite, endocardite, bacteremia, especialmente em pacientes internados em unidades de terapia intensiva (UTIs), unidades neonatais e enfermarias de neurocirurgia (Tomaras, Dorsey, Edelman, Actis, 2003; Lee et al., 2008; Rao et al., 2008; Nucleo et al., 2009; Tiwari, Vashistt, Kapil, Moganty, 2012). Sua importância clínica se deve, entre outros fatores, à sua capacidade de

regular ou adquirir resistência aos antimicrobianos e sua capacidade de formar biofilmes em dispositivos médicos, o que contribui para a sua persistência no ambiente hospitalar (Roberts et al., 2001; Peleg et al., 2008; de Breij et al., 2010).

Castilho e colaboradores realizaram um estudo em Goiás, com 1.333 pacientes de cinco UTIs e encontraram *A. baumannii* em 4,8 % desses pacientes (Castilho et al., 2017). O estudo mostrou que 91,1% desses isolados eram multirresistentes e 76,8 % eram capazes de formar biofilme. Outro estudo realizado em Belo Horizonte, por Cardoso e colaboradores, no período de 2007 a 2012, com 189 pacientes com úlceras infectadas em pés diabéticos, mostrou que *A. baumannii* foi o micro-organismo mais frequente (24,4%) (Cardoso et al., 2017). Esses dados retratam a importância desse patógeno em casos de IRAS.

2.2.2 *Pseudomonas aeruginosa*

Pseudomonas aeruginosa é um BGN-NF pertencente a família *Pseudomonadaceae*, da ordem *Pseudomonadales*, contendo, atualmente, 238 espécies (LPSN, 2016-<http://www.bacterio.net/pseudomonas.html>). Esse patógeno se apresenta na forma de bastonetes, retos ou curvos, de 0,5 a 0,8 µm de largura por 1,5 a 3,0 µm de comprimento, aproximadamente, sendo que as células podem ser visualizadas ao microscópio como isoladas, aos pares ou em cadeias curtas (Figura 2-B) (Ferreira et al., 2010).

Esse micro-organismo é ubíquo, não-esporulado, com predileção por ambientes úmidos, sendo encontrado no solo, água e plantas. Produz a enzima oxidase, é aeróbio, mas pode crescer em condições de anaerobiose utilizando o nitrato ou a arginina como aceptor final de elétrons, é móvel devido à presença de um flagelo polar (pode ter dois ou três) (Figura 2-C), produz pigmentos hidrossolúveis, tais como a pioverdina (pigmento fluorescente) e a piocianina (pigmento fenazina de cor azul), responsáveis pela cor característica verde brilhante. Algumas linhagens também produzem outros pigmentos hidrossolúveis como piorrubina (avermelhado para o marrom) ou piomelanina (marrom a preto). Conseguem ser tolerante a uma variedade de temperaturas (4°C a 42°C), sobrevivem por longos períodos em ambientes úmidos e são capazes de utilizar diversos compostos orgânicos como fonte de carbono e nitrogênio, além de

crescer em meios de cultura contendo somente acetato como fonte de carbono e sulfato de amônio como fonte de nitrogênio (Pollack, 1995).

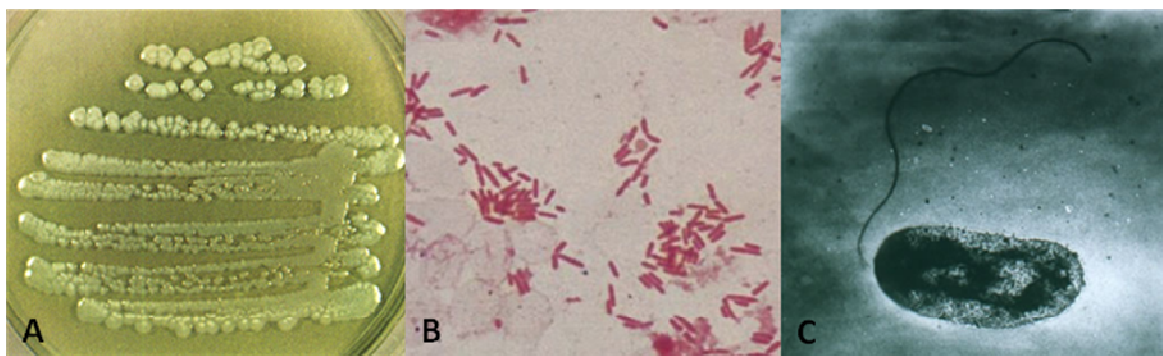


Figura 2: *Pseudomonas aeruginosa* observada em A: semeadura em ágar nutrienste; B: Coloração de Gram visualizada em microscopia óptica; C: Microscopia eletrônica de transmissão. Fonte: <http://www.ibb.unesp.br/>.

O morfotipo mucóide é devido a produção de grandes quantidades de um mucopolissacarídeo denominado alginato que envolve a célula (Figura 2-A). A sua produção é, em muitos casos, responsável pelo mau prognóstico e pelas altas taxas de mortalidade entre os pacientes com fibrose cística (Pollack, 1995).

P. aeruginosa raramente causa infecções em indivíduos saudáveis, por mais que ela seja patogênica tanto para plantas como para animais. Porém, é bastante tolerante a várias condições físicas adversas, não necessita de muitos nutrientes para crescer e também possui resistência intrínseca e adquirida a diversas classes de agentes antimicrobianos, o que o torna um patógeno importante relacionado a etiologia de infecções relacionadas à assistência à saúde (Blondel-Hill et al., 2007; Pappas et al., 2009; Strateva & Yordanov, 2009).

Esse micro-organismo pode causar desde infecções superficiais da pele até sepse fulminante. Ainda pode causar infecção aguda pela produção de toxinas e infecção crônica pela ação da camada espessa que consiste no seu biofilme, e ainda, pode resultar no somatório dos tipos de infecção pela ação concomitante desses componentes (Palleroni, 1998). Além disso, é um importante patógeno respiratório em pacientes com fibrose cística, doença genética que apresenta como manifestações clínicas principais a doença pulmonar obstrutiva

crônica e a insuficiência pancreática exócrina. A água presente em equipamentos de terapia respiratória, quando contaminada pode atingir com facilidade pacientes internados, principalmente em uso de antimicrobianos e submetidos a procedimentos invasivos (Knowles et al., 1995; Barth, Pitt, 1998).

2.3 ANTIMICROBIANOS CARBAPENÊMICOS

A maioria dos antimicrobianos utilizados para o tratamento de infecções bacterianas está classificada de acordo com seu principal mecanismo de ação, que são: inibição da síntese proteica, interferência na síntese de ácidos nucleicos, inibição de vias metabólicas, rompimento da membrana celular e interferência na síntese da parede celular (Tabela 1) (Tenover, 2006).

Tabela 1: Classificação dos antimicrobianos mais comumente utilizados na prática clínica para tratamento de infecções bacterianas.

| Mecanismo de ação | Mecanismo de ação específico | Classe (Exemplo de antimicrobiano) |
|--|---|---|
| Interferência na síntese da parede celular | Ligação às proteínas ligadoras de penicilinas | Beta-lactâmicos (Penicilinas, Cefalosporinas, Carbapenemas e Monobactâmicos) |
| | Inibição da enzima MurA | Fosfomicinas |
| | Ligação a D-alanina | Glicopeptídeos (Vancomicina e Teicoplanina) |
| Inibição da síntese proteica | Ligam-se a subunidade ribossomal 50S | Cloranfenicol, Macrolídeos (Eritromicina), Lincosamidas (Clindamicina), Oxazolidinonas (Linezolida) |
| | Ligam-se a subunidade ribossomal 30S | Aminoglicosídeos (Amicacina e Gentamicina), Glicilciclina (Tigeciclina) e Tetraciclinas |
| Interferência na síntese de ácidos nucleicos | Inibe a síntese de DNA | Quinolonas (Ciprofloxacina) |
| | Inibe a síntese de RNA | Rifampicina |
| Inibição de vias metabólicas | Inibe a via de síntese do ácido fólico | Sulfonamidas |
| Rompimento de membrana plasmática | Aumentam a permeabilidade da membrana | Polimixinas |

Fonte: Adaptado de Tenover (2006).

Os beta-lactâmicos foram os primeiros antimicrobianos a serem descritos e até hoje são o maior grupo usado na prática clínica. Eles atuam inibindo as enzimas PBPs (proteína ligante de penicilina - *penicillin binding protein*) que participam da síntese da camada de peptidoglicano, o composto mais importante da parede celular bacteriana, causando, dessa forma, falha na formação da parede celular e, conseqüentemente, a morte da célula bacteriana. Por atuar em

uma enzima específica de bactérias, os beta-lactâmicos possuem baixa toxicidade para o ser humano (Suárez & Gudiol, 2009).

Uma característica comum na estrutura da molécula deste grupo de antibióticos é a presença do anel beta-lactâmico. As propriedades da molécula podem ser alteradas adicionando diferentes cadeias lineares aos anéis beta-lactâmicos, o que resulta em quatro tipos de beta-lactâmicos que existem atualmente: penicilinas, cefalosporinas, monobactâmicos e carbapenêmicos (Figura 3). Dentro de cada grupo, pequenas alterações são capazes de modificar as características dos antimicrobianos, como: espectro de ação, afinidade por receptores e resistência às beta-lactamases (Suárez, Gudiol, 2009).

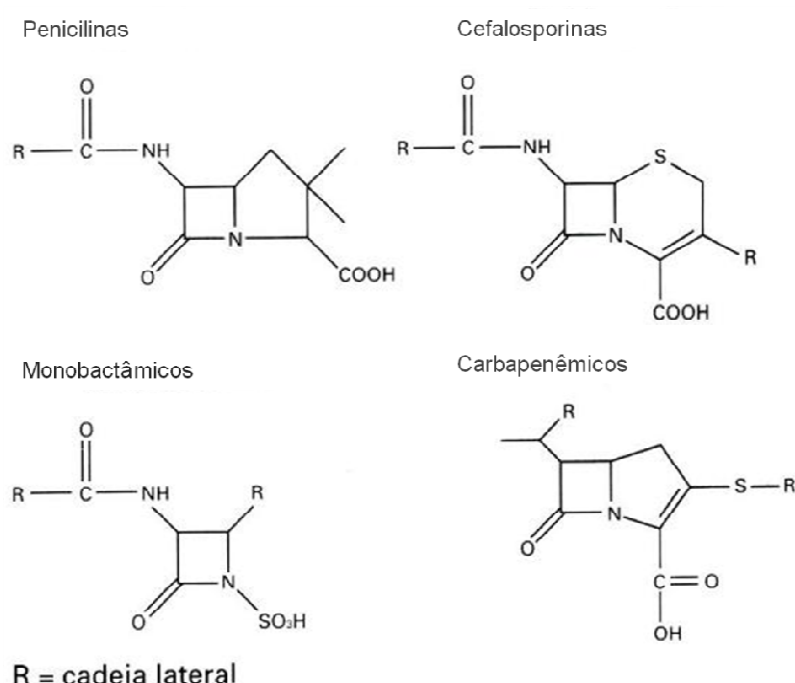


Figura 3: Estrutura química das quatro classes de beta-lactâmicos. Fonte: Adaptado de Williams (1999).

Os carbapenêmicos são os beta-lactâmicos de maior espectro de ação, sendo indicados para o tratamento de infecções graves causadas por Gram-negativos e positivos e organismos produtores de beta-lactamases. São frequentemente usados como "agentes de última linha" ou "antibióticos de última instância". O surgimento de micro-organismos multirresistentes significa uma séria ameaça, podendo comprometer o uso dessa classe de medicamento (Papp-Wallace, Endimiani, Taracila, Bonomo, 2011).

A descoberta dos carbapenêmicos se iniciou de forma acidental, pois no final da década de 1960 o uso da penicilina foi comprometido pelo surgimento de bactérias resistentes a esse fármaco e, a partir de então, foram iniciadas pesquisas para descobrir inibidores de beta-lactamases. No ano de 1976 foram descobertos os primeiros inibidores, dentre eles os ácidos olivânicos, que possuíam um esqueleto de carbapenem, contudo devido a sua instabilidade química e fraca penetração na célula, não foram prosseguidos os estudos com estes compostos. Após alguns anos, foram descobertos dois inibidores superiores: o ácido clavulânico e a tienamicina (Figura 4-A) (Kahan, 1979; Miyadera, 1983).

A tienamicina demonstrou atividade antibacteriana de largo espectro e atividade inibitória em beta-lactamase, porém, seu rendimento era baixo. Com o tempo a preparação sintética ganhou importância e foi descoberto um derivado chamado imipenem. Assim como outros beta-lactâmicos, a tienamicina se ligava às PBPs e com o tempo, o interesse por este composto cresceu rapidamente, uma vez que o mesmo exibiu atividade inibitória contra bactérias Gram-negativas, incluindo isolados de *Pseudomonas aeruginosa* e bactérias Gram-positivas, como *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus* (Miyadera, 1983).

Infelizmente, verificou-se que a tienamicina era instável em solução aquosa, sensível a hidrólise em pH básico e altamente reativa. A instabilidade química da tienamicina estimulou a busca de derivados análogos com maior estabilidade. O primeiro derivado desenvolvido foi o imipenem e, mais tarde, o panipenem, ambos sensíveis à hidrólise em solução (Figura 4-B). Em 1985, o imipenem tornou-se o primeiro carbapenêmico disponível para o tratamento de infecções microbianas complexas e, assim como a tienamicina, demonstrou alta afinidade para as PBPs e estabilidade contra as beta-lactamases. No entanto, tanto o imipenem como o panipenem foram susceptíveis à desativação pela deidropeptidase renal I (DHP-I), encontrada na borda da escova renal humana e, portanto, a co-administração com um inibidor, cilastatina foi necessária (Norrby, 1983; Hashizume, 1984).

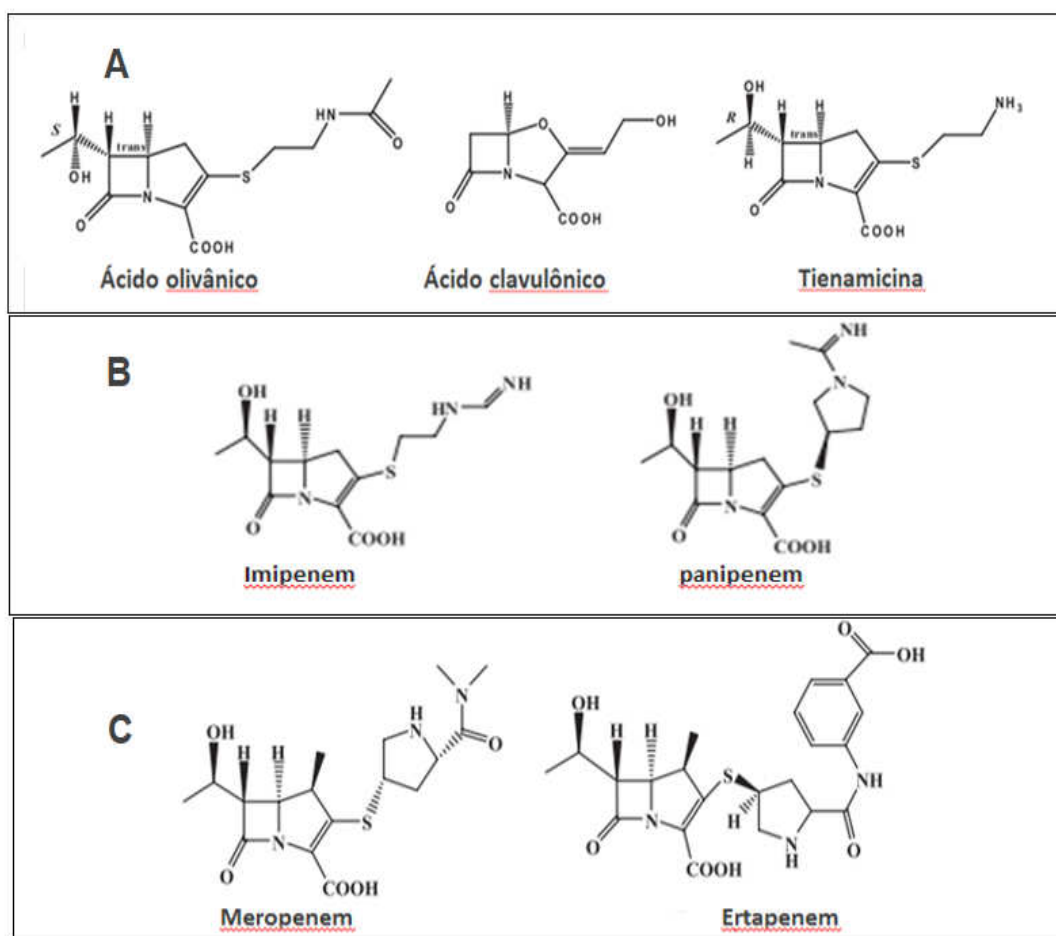


Figura 4: Estrutura química das moléculas de carbapenêmicos. Adaptado de Papp-Wallace (2011).

Ao longo deste caminho foram descobertos outros carbapenêmicos, como o meropenem e o ertapenem (Figura 4-C). A síntese do meropenem foi um avanço muito importante na área de desenvolvimento dos carbapenêmicos, pois, além de ser estável à hidrólise causada pela maioria das beta-lactamases, este fármaco não é hidrolisado pela deidropeptidase renal I, o que permite a sua utilização sem a cilastatina. De um modo geral, os carbapenêmicos penetram em bactérias Gram-negativas através de proteínas da membrana externa (OMPs), também conhecidas como porinas e, após atravessarem o espaço periplasmático, se ligam permanentemente às PBPs causando morte da célula bacteriana (Papp-Wallace, 2011).

2.4 RESISTÊNCIA BACTERIANA AOS BETA-LACTÂMICOS

Muitos mecanismos de resistência têm sido observados entre os micro-organismos, sendo classificados entre intrínsecos e adquiridos. A resistência intrínseca é aquela onde todos os isolados da mesma espécie/gênero vão apresentar resistência a um determinado antimicrobiano e na resistência adquirida, bactérias, inicialmente susceptíveis, se tornam resistentes a um agente antimicrobiano devido a fenômenos de mutação ou pela aquisição de genes de resistência via elementos genéticos móveis. Dessa forma, esses mecanismos fazem com que muitas espécies de bactérias se adaptem de forma rápida ao uso de novos agentes antimicrobianos em seu ambiente (Dzidic, Suskovic, Kos, 2008).

A transmissão de genes de resistência entre as bactérias possibilita a disseminação da resistência aos antimicrobianos de forma bastante eficiente, sendo que essa transmissão pode ocorrer por dois mecanismos, o vertical e horizontal. Na transmissão vertical, os genes são transmitidos através da divisão celular, onde a célula-mãe transfere o material genético para a célula-filha. A transferência horizontal ocorre através de elementos genéticos móveis, como plasmídeo, transpóson e também por bacteriófagos (Frost et al., 2005; Siefert, 2009;).

Entre os mecanismos de resistência, o que apresenta maior destaque é a produção de enzimas inativadoras dos antimicrobianos. Existem três estratégias químicas que as enzimas utilizam para promover a inativação: transferência de grupos (que ocorre em diferentes classes de fármacos, incluindo fenômenos de fosforilação, glicosilação, ribosilação e transferência de grupos thiol), mecanismos de oxidação (que ocorre com as tetraciclinas) e hidrólise (que ocorre, principalmente, com os beta-lactâmicos).

2.4.1 Beta-lactamases

O principal mecanismo de resistência aos antimicrobianos beta-lactâmicos em bacilos Gram-negativos é a produção de enzimas beta-lactamases. Essas

enzimas hidrolizam o anel beta-lactâmico desses fármacos, formando um derivado ácido, sem atividade terapêutica (Livermore, 2001).

As enzimas beta-lactamases podem ser classificadas com base em suas características funcionais ou por sua estrutura primária. A classificação mais simples é a de Ambler, onde as enzimas são distribuídas em quatro classes (A, B, C e D). As enzimas do grupo A, C e D são as serino-beta-lactamases, pois possuem o aminoácido serina no sítio ativo da enzima e as enzimas da classe B possuem Zinco (Zn^{2+}) no sítio ativo, sendo consideradas metalo-beta-lactamases (Ambler, 1980; Medeiros, 1995; Bush, Jacoby, 2010). Essas classificações estão detalhadas na Tabela 2, abaixo.

Tabela 2: Classificação das beta-lactamases.

| Grupo Funcional Bush-Jacob | Classe Molecular | Exemplos | Características |
|----------------------------|------------------|---|---|
| 1 | C | AmpC de <i>P.aeruginosa</i> e <i>E. coli</i> ; CMY-2, FOX-1, MIR-1. | Enzimas cromossômicas e plasmidiais produzidas por bactérias Gram-negativas que conferem resistência às cefalosporinas e cefamicinas e não são inibidas por ácido clavulânico e tazobactam. |
| 1e | C | GC1, CMY-37. | Enzimas que hidrolisam penicilinas, cefamicinas, cefalosporinas de amplo espectro e monobactâmicos. |
| 2a | A | PC1 e outras penicilinases de <i>Staphylococcus</i> spp. Penicilinases produzidas por <i>Staphylococcus</i> spp. e <i>Enterococcus</i> spp. | Enzimas que conferem altos níveis de resistência à penicilina e são inibidas por ácido clavulânico e tazobactam. |
| 2b | A | SHV-1, TEM-1, TEM-2, TEM-90 | Enzimas que hidrolisam, de forma eficiente, penicilinas e cefalosporinas das primeiras gerações e são inibidas por ácido clavulânico e tazobactam. |
| 2be | A | ESBLs: CTX-M-15, CTXM-44, PER-1, SFO-1, SHV-5, TEM-10, TEM-26, | Conferem resistência às penicilinas, cefalosporinas de amplo espectro e monobactâmicos. |
| 2br | A | TEM-30, TEM-76, TEM-103, SHV-10, SHV-26. | Enzimas que hidrolisam, de forma eficiente, penicilinas e cefalosporinas das primeiras gerações, contudo não são bem inibidas por ácido clavulânico. |
| 2ber | A | TEM-50, TEM-68, TEM-89 | Promovem a hidrólise de penicilinas, cefalosporinas, monobactâmicos e são pouco inibidas por ácido clavulânico e tazobactam. |
| 2c | A | PSE-1, CARB-3 | Enzimas que hidrolisam penicilinas e carbenicilina e são inibidas por ácido clavulânico. |
| 2d | D | OXA-1, OXA-10 | Enzimas que hidrolisam a cloxacilina e são levemente inibidas por ácido clavulânico. |
| 2de | D | OXA-11, OXA-15 | Hidrólise de penicilinas e cefalosporinas de amplo espectro, sendo pouco inibidas por ácido clavulânico. |
| 2df | D | OXA-23, OXA-48 | Hidrolisam carbapenemas e cloxacilina, sendo pouco inibidas por ácido clavulânico. |
| 2e | A | CepA | Cefalosporinases inibidas por ácido clavulânico e tazobactam, contudo não são inibidas por aztreonam. |
| 2f | A | IMI-1, KPC-2, KPC-3, SME-1, GES-2 | Enzimas que hidrolisam carbapenemas. Estas enzimas são pouco inibidas por ácido clavulânico e tazobactam. |
| 3a | B | IMP-1, L1, NDM-1, VIM-1 | Metallo-beta-lactamases. Hidrólise de todos os betalactâmicos exceto monobactâmicos. Inibidas por EDTA e quelantes de metais, não inibidas por ácido clavulânico e tazobactam. |
| 3b | B | CphA, Sfh-1 | Hidrólise preferencial de carbapenemas. Inibidas por EDTA e quelantes de metais, não inibidas por ácido clavulânico e tazobactam. |

Fonte: Adaptado de Bush, 2010

As ESBLs (Beta-lactamase de espectro estendido) são definidas como enzimas das classes A ou D na classificação de Ambler. São capazes de hidrolisar penicilinas de amplo espectro, cefalosporinas de terceira geração e monobactâmicos. Atualmente, existem mais de 500 diferentes ESBLs descritas, sendo a maioria derivada das enzimas TEM ou SHV. As ESBLs mais frequentemente encontradas são do tipo TEM, SHV e CTX-M, entretanto as do tipo OXA, PER, VEB, BES, CMY e GES também tem sido bastante reportadas (Paterson, Bonomo, 2005; Bush, Fisher, 2011; Hakemi, 2014).

As enzimas da classe B são chamadas de metalo-beta-lactamases. Essas enzimas conferem resistência a todos os beta-lactâmicos, com exceção dos monobactâmicos. Uma característica importante desse grupo é que ele não é inibido pelos inibidores tradicionais de beta-lactamases. Possuem um átomo de zinco divalente em seu sítio ativo, e devido a esse motivo, são sensíveis a ação de quelantes, como o EDTA. As MBLs que são encontradas mais frequentemente são IMP e VIM, disseminadas pelo mundo todo (Queenan, Bush, 2007) e mais recentemente a NDM-1, oriunda, principalmente, da Índia, Paquistão, Reino Unido, China e países do norte da África (Dortet, Poirel, Nordmann, 2014; Zafer et al., 2014; Khorsi et al., 2015; Paul et al., 2016; Ramoul et al., 2016).

As carbapenemases são membros da classe molecular A, B e D de Ambler e, atualmente, pesquisadores de várias partes do mundo tem voltado sua atenção para essas enzimas, que são consideradas o mecanismo de resistência mais importante e que apresentam variadas capacidades hidrolíticas, tendo a capacidade de hidrolisar penicilinas, cefalosporinas, monobactâmicos e carbapenêmicos. Micro-organismos produtores dessas enzimas apresentam poucas opções de tratamento, sendo considerados um problema mundial e colocando em risco a vida dos pacientes. Apesar de serem chamadas de carbapenemases, elas são capazes de hidrolisar totalmente ou parcialmente a maioria dos beta-lactâmicos e não são inibidas pela maioria dos inibidores de beta-lactamases (Ambler, 1980; Queenan, Bush, 2007; Bonnin et al., 2011).

As carbapenemases da classe A podem ser cromossômicas e plasmidiais, como a *Klebsiella pneumoniae carbapenemase* (KPC), sendo que todas hidrolisam os carbapenêmicos. As KPC são as enzimas mais comuns neste grupo e a mais prevalente no mundo (Yigit et al., 2001). As carbapenemases de classe

D de Ambler, também conhecidas como oxacilinases (OXA), são chamadas assim pois têm a oxacilina como substrato preferencial e, em geral, são fracamente inibidas pelo ácido clavulânico, EDTA, tazobactam e sulbactam, mas sua atividade pode ser inibida *in vitro* por cloreto de sódio (Ambler, 1980).

As oxacilinases são caracterizadas por apresentarem uma grande diversidade genética e hidrolisarem variados beta-lactâmicos, porém, não são todos os tipos dessas enzimas que possuem capacidade de hidrolisar os carbapenêmicos. Os genes codificadores de oxacilinases podem ser encontrados no cromossomo ou em plasmídeos, associados a integrons, sequências de inserção e transpósons em amostras clínicas e ambientais (Peleg et al., 2008; Poirel et al., 2010).

Segundo Jacob e Bush, atualmente, são reconhecidas mais de 363 enzimas oxacilinases divididas em 11 grupos. Destas, pelo menos 65 apresentam atividade contra os carbapenêmicos (Jacob, Bush, 2014). Dos 11 grupos, atualmente, existem seis subgrupos de oxacilinases com atividade sobre os carbapenemas em *Acinetobacter* spp.: a OXA-51, um subgrupo de enzima cromossômica que é intrínseca a espécie *A. baumannii* e possui mais de 70 variantes e as enzimas adquiridas: OXA-23, OXA-24, OXA-58 e OXA-143, que já foram relatadas em *A. baumannii* no Brasil (Poirel et al., 2011). A presença destas enzimas possibilita diferentes níveis de resistência e a coexistência com uma outra oxacilinase é comum (Peleg et al., 2008; Opazo et al., 2012).

2.4.2 Resistência a carbapenêmicos em *Acinetobacter baumannii* e *Pseudomonas aeruginosa*

Inicialmente, *A. baumannii* foi considerado um micro-organismo de baixa virulência, porém, estudos recentes têm mostrado que este micro-organismo é mais virulento do que foi visto inicialmente (Falagas et al., 2006; Gaddy et al., 2009; Smani et al., 2011; Smani et al., 2012). O ambiente hospitalar representa um importante reservatório para *A. baumannii*, especialmente em pacientes que permanecem em diversas unidades por um tempo longo, pois podem ser colonizados por este patógeno e disseminá-lo por longos períodos sem sintomas visíveis. A persistência deste micro-organismo está relacionada à resistência

múltipla aos fármacos, o que possibilita que o mesmo sobreviva a terapias antimicrobianas prolongadas em pacientes hospitalizados (Nucleo et al., 2009).

Os carbapenêmicos são os fármacos de escolha para o tratamento de infecções causadas por bacilos Gram-negativos multirresistentes (Quale et al., 2003). Contudo, a resistência de *A. baumannii* aos mesmos tem aumentado em todo o mundo na última década (Sohrabi et al., 2012). Esse fato torna-se preocupante, uma vez que limita bastante as alternativas terapêuticas e, dessa forma, o tratamento se torna reduzido ao uso de polimixinas e tigeciclina, porém, a resistência a esses antimicrobianos já foi relatada (Gan et al., 2012).

Em um estudo realizado pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa) mostrando a frequência dos principais fenótipos de resistência a antimicrobianos encontrados entre os micro-organismos responsáveis por causarem infecções primárias de corrente de sanguínea confirmada laboratorialmente (IPCSL) associadas a cateter venoso central (CVC), foram observadas taxas elevadas de resistência aos carbapenêmicos entre os bacilos Gram-negativos. Nos bacilos Gram-negativos não fermentadores a resistência aos carbapenêmicos foi de 79,3% entre *Acinetobacter* spp. e 41,6% entre *P. aeruginosa*.

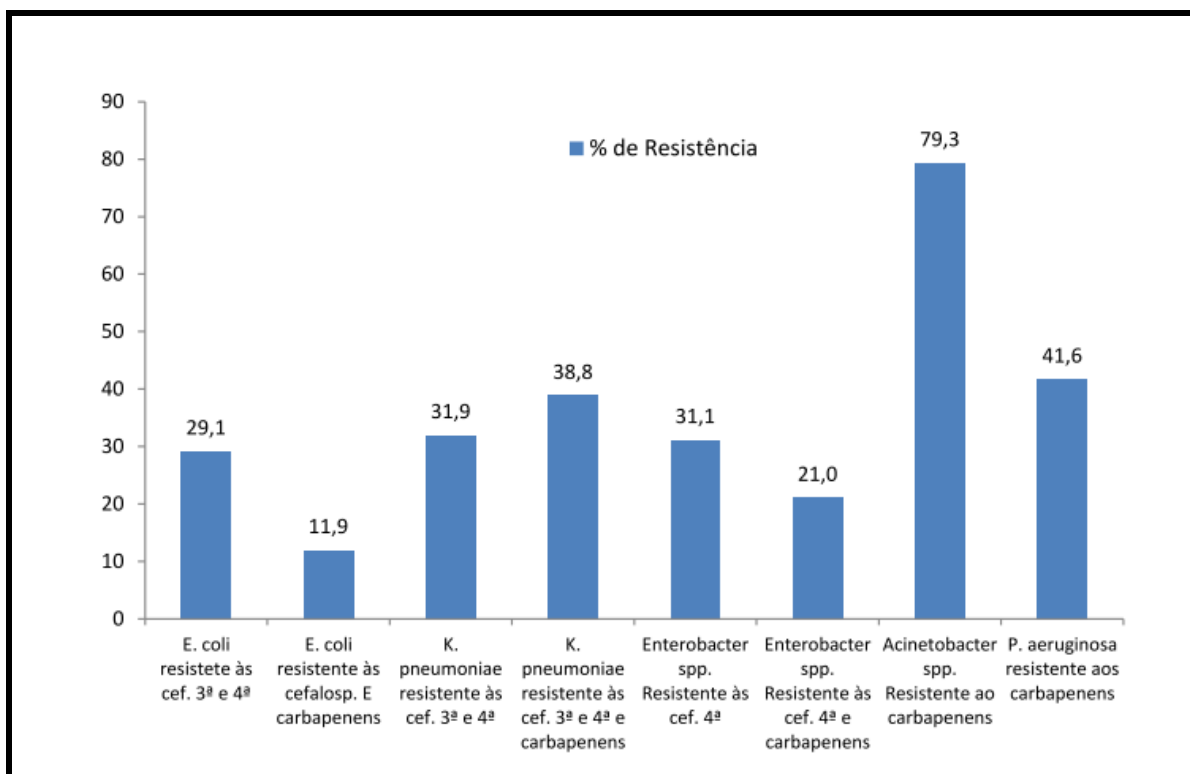


Figura 5: Porcentagens dos fenótipos de resistência entre os bacilos Gram-negativos mais frequentemente notificados como agentes etiológicos de infecções primárias de corrente de sanguínea confirmada laboratorialmente (IPCSL) associada a catéter venoso central (CVC) em pacientes adultos hospitalizados em UTIs. Fonte: ANVISA, 2015.

As enzimas carbapenemases encontradas em *A. baumannii* são, geralmente, do tipo OXA carbapenemases (oxacilinas). A primeira enzima desse grupo, que foi identificada com atividade sobre os carbapenêmicos, foi descrita na Escócia em 1985, sendo inicialmente chamada de ARI-1, localizada em um plasmídeo de fácil transferência. Após o seu sequenciamento, a enzima ARI-1 recebeu o nome de OXA-23 (Opazo et al., 2012). Tem-se observado que os altos níveis de resistência aos carbapenêmicos, causada pela expressão de genes codificadores de oxacilinas, ocorre devido à presença de um forte promotor, como a sequência de inserção *ISAbal*, que é encontrada com frequência em *A. baumannii* (Carvalho et al., 2009). Mesmo que as enzimas do tipo OXA sejam as carbapenemases mais encontradas em *A. baumannii*, também existem relatos da presença das variantes de MBLs IMP-1 e IMP-6 no Brasil (Tognim et al., 2004).

Em três diferentes estudos, um realizado em 10 hospitais de países da América latina (Brasil, Chile, Argentina e México), outro realizado em 36 hospitais do Brasil e outro realizado no sul da Índia, foi relatado um aumento significativo nas taxas de resistência ao imipenem em *A. baumannii*. Esse aumento da resistência tem sido associado, principalmente, à propagação de clones produtores de OXA-23 e, em menor escala, de OXA-143 (Antonio et al., 2011; Gales et al., 2012; Laishram, 2016).

P. aeruginosa é um dos principais patógenos que causam infecções de corrente sanguínea (ICS) e pneumonia, sendo que muitas dessas complicações são de difícil tratamento, pois as opções de antimicrobianos são limitadas (Yang et al., 2011). Os antimicrobianos mais utilizados para o tratamento de infecções causadas por *P. aeruginosa* são os carbapenêmicos, principalmente em ICS. Porém, tem sido observado um número crescente de resistência a essa classe de antimicrobianos (Witney et al., 2014).

A resistência aos carbapenêmicos em *P. aeruginosa* pode ter uma origem cromossômica, por mutações nos genes, ou pela aquisição horizontal de genes codificadores de carbapenemases. Um dos principais mecanismos de resistência de origem cromossômica é a repressão ou inativação da OprD, uma porina que permite a passagem de carbapenêmicos pela membrana externa da célula bacteriana, conferindo resistência ao imipenem e reduzida sensibilidade ao meropenem. Outro mecanismo eficiente de resistência aos carbapenêmicos é a produção de uma beta-lactamase cromossômica, chamada AmpC, que pode ser encontrada em diferentes genes reguladores e também pela aquisição ou produção de outras beta-lactamases (Mushtaq, Livermore, 2004; Juan et al., 2005; Moya et al., 2009).

As principais carbapenemases encontradas em *P. aeruginosa* são do tipo MBLs. Atualmente, estão descritas centenas de MBLs sendo, IMP e VIM, as mais prevalentes no mundo (Witney et al., 2014). No Brasil em 2006, um estudo realizado no Rio de Janeiro, relatou a ocorrência de uma epidemia onde observou-se a presença de SPM-1 em 20% de linhagens de *P. aeruginosa* resistentes a imipenem (Carvalho et al., 2006). Outro estudo realizado com 44 amostras de BGN-NF em um hospital de São Paulo, em 2009, verificou que 72,7% eram

produtores de MBL, sendo 31,23% apresentando SPM-1 e 68,7% apresentando IMP-1 (Picão et al., 2009).

2.5 EPIDEMIOLOGIA DE *Acinetobacter baumannii* e *Pseudomonas aeruginosa*

A tipagem de agentes infecciosos e o estabelecimento do grau de similaridade entre cepas envolvidas em infecções nosocomiais, principalmente quando comparado a amostras isoladas em casos de infecção esporádica ou em caso de infecção comunitária, permitem a formulação de hipóteses sobre a existência de clones apresentando características especiais de virulência e sobre a transmissão hospitalar desses agentes (Tenover et al., 1997; Olive, Bean, 1999).

As metodologias de tipagem molecular se baseiam em diferenças na sequência ou na organização do DNA genômico para realização de discriminação entre as cepas e tem sido as mais utilizadas atualmente para a análise do polimorfismo genético das linhagens bacterianas. Apesar de existirem várias técnicas moleculares frequentemente usadas em laboratórios para caracterização epidemiológica, a fragmentação do DNA genômico seguida de eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE) e a técnica de MLST ("*multilocus sequence typing*" - tipagem baseada em sequenciamento de multi-locos) (Sader et al., 1993; Singh et al., 2006; Peleg et al., 2008) são amplamente utilizadas.

A técnica de PFGE gera padrões específicos de bandas de DNA e consiste no aprisionamento do DNA total das cepas em blocos de agarose, seguido pela digestão com enzimas de restrição específicas. Devido ao fato das endonucleases de restrição possuírem atividade em sequências conhecidas, o perfil de bandas pode ser analisado e as linhagens da mesma espécie podem ser relacionadas entre si (Singh et al., 2006).

MLST é um método de tipagem altamente discriminatório que tem sido aplicado a uma variedade de patógenos bacterianos. Esta metodologia se baseia na amplificação de genes conservados do genoma, seguido de sequenciamento, onde cada um dos genes é sequenciado e a sequência obtida é comparada com as já existentes nos bancos de dados. O número de alelo é fornecido para cada

um dos sete genes. Assim, a combinação de todos os números de alelos gera o ST (*sequence type*), que pode ser comparado com os STs já descritos no banco de dados. Uma vantagem desse método é a facilidade de comparação interlaboratorial. Como essa técnica gera sequências de DNA e não padrões de bandas, os resultados podem ser comparados em qualquer lugar do mundo, sem que haja critérios interpretativos envolvidos. Dessa forma, essa metodologia se apresenta mais adequada para investigações epidemiológicas de longos períodos e de cepas não relacionadas geograficamente (Peleg et al., 2008).

Numerosos relatos de surtos em UTIs causados por *A. baumannii* têm sido publicados em diversos países na última década, principalmente na Europa, América do Norte e América Latina. O contexto epidemiológico-molecular destes surtos é variável, uma vez que alguns estudos reportaram surtos monoclonais associados a um determinante de resistência, enquanto outros relataram surtos policlonais (Fournier e Richet, 2006; Turton et al., 2006; Furtado et al., 2006; Dalla-Costa et al, 2003). Na Europa, alguns trabalhos têm associado os surtos à disseminação dos três clones europeus (*European clone* (EU) I, II e III) em vários países. Enoch e colaboradores descreveram um surto com duração de seis meses em Cambrigde, Inglaterra. Nesse trabalho, 16 casos ocorreram na unidade de cuidados críticos de pacientes neurológicos e três casos ocorreram na UTI. O surto foi caracterizado como monoclonal e causado pelo EU I (Enoch et al., 2008).

No Brasil, o primeiro surto associado a cepas multirresistentes desta bactéria ocorreu em 1999, em Curitiba, com a identificação de cepas produtoras de OXA-23 (Dalla-Costa et al., 2003). Em diferentes regiões do Brasil já foram descritos surtos semelhantes, como no Rio de Janeiro e em Porto Alegre (Podnos et al., 2001; Garcia et al., 2011). Na cidade de Porto Alegre, em 2007 houve um surto de grandes proporções envolvendo diversos hospitais, o qual culminou com o fechamento de pelo menos três UTIs. Através da tipagem molecular foi possível constatar a disseminação interinstitucional de três clones comuns e a disseminação de um clone comum presente em equipamentos médicos e em pacientes com infecção (Garcia et al., 2011)

Atualmente, três clones de *A. baumannii* têm sido amplamente distribuídos, sendo denominados "clones internacionais" (IC), os quais possuem alta capacidade de adquirir resistência aos antibióticos. Foram reconhecidos: IC1, IC2

e IC3, sendo que o IC2 é o mais amplamente disperso, já encontrado em pelo menos 34 países (Karah et al., 2012).

Recentemente, foi estudado um surto ocorrido no período de julho a dezembro de 2011, na cidade de Vigo, Espanha, em um hospital Universitário. Nesse estudo foi observada a presença de um clone predominante, pertencente ao ST187 que está incluído no IC1 (Martínez-lamas et al., 2014). Em outro estudo, realizado no período de outubro de 2008 a maio de 2011, com 26 isolados de *A. baumannii* resistentes aos carbapenêmicos provenientes de dois hospitais de Catania, Itália, foi observada uma predominância do gene *bla*_{OXA-24} e foi verificado que o ST2 foi prevalente (Agodi et al., 2014).

No Brasil, um estudo de 155 isolados de *A. baumannii* representando as cinco regiões brasileiras, incluindo 11 estados (MS, AL, AM, BA, DF, ES, GO, MG, RJ, RN, SC) foi realizado no período de fevereiro de 2008 a janeiro de 2011. O grupo verificou que 146 isolados apresentavam o gene *bla*_{OXA-23}, sendo estes isolados agrupados em 28 genótipos. Foram identificados 13 STs, sendo os predominantes ST15, ST1 e ST79 (Chagas et al., 2014).

Cieslinski e colaboradores realizaram um estudo em oito hospitais do Paraná, no período de maio de 2009 à agosto de 2011, onde foi observado que todos os 46 isolados de *A. baumannii* apresentavam o gene *bla*_{OXA-23}. Matholouthi e colaboradores avaliaram 36 isolados de *A. baumannii* resistentes ao imipenem, proveniente de dois hospitais da Líbia coletados de janeiro a maio de 2015. Entre esses isolados 29 apresentavam o gene *bla*_{OXA-23} e 8 apresentavam o gene *bla*_{NDM-1}. O clone predominante foi o ST2.

Normalmente, pesquisas de epidemiologia molecular de isolados de *P. aeruginosa* recuperados de infecções hospitalares, revelam uma notável diversidade clonal, com a maioria dos isolados representados por genótipos individuais. Além disso, apesar do grande (mais de 2000) e crescente número de STs descritos, a detecção de novas variantes ainda é muito frequente nos estudos mais recentes. Atualmente, existem três principais clones internacionais de alto risco: ST111, ST175 e ST235 (Peña et al., 2015). Desses, o ST235 é certamente aquele que tem a mais ampla distribuição, sendo encontrado em muitos países dos cinco continentes. Além desses três grandes clones de alto

risco, o ST277 é de particular relevância, sendo prevalente no Brasil e, ocasionalmente, detectado em outros locais (Silva et al., 2011).

Na maioria dos isolados de *P. aeruginosa* que apresentam MBLs ou ESBLs o ST235 é o mais freqüente, seguido por ST111. As enzimas PER, KPC, IMP, VIM são as mais prevalentes em isolados pertencentes a esses clones e as mais disseminadas geograficamente (Oliver et al., 2015).

Um estudo realizado em 27 hospitais na China, envolvendo 254 isolados de *P. aeruginosa* durante o período de agosto de 2011 e julho de 2012 demonstrou que 233 isolados apresentaram resistência aos carbapenêmicos e através de análises moleculares foram detectados, mais prevalentemente, os genes *bla_{IMP}*, *bla_{VIM}* e *bla_{KPC}*. Nesse estudo foram encontrados 91 STs entre as amostras, sendo os mais prevalentes ST292, ST244, ST277, ST235 e ST699 (Fan et al., 2016). Outro estudo, realizado em Curitiba, Brasil, analisou 142 isolados de *P. aeruginosa* resistentes aos carbapenêmicos, no período de janeiro à dezembro de 2008 e os resultados mostraram que 87 isolados apresentaram o gene *bla_{SPM-1}* e um genótipo predominante foi encontrado entre esses isolados (Lucena et al., 2014).

Zafer em um estudo realizado em dois hospitais do Egito, no período de janeiro de 2011 à janeiro de 2012, com 33 isolados de *P. aeruginosa*, demonstrou que o gene *bla_{VIM-2}* foi o mais prevalente, presente em 28 isolados. Foi identificado 11 STs diferentes, sendo o ST233 o mais prevalente (Zafer et al., 2014).

Estudo realizado por Mikucionyte, no período de janeiro de 2011 a junho de 2012, coletou 73 isolados de *P. aeruginosa* multirresistentes de um hospital da Lituania. Foi identificada a presença do gene *bla_{VIM-2}* em 16 isolados, *bla_{GES}* em dois isolados e *bla_{PER-1}* em um isolado. 15 isolados *bla_{VIM-2}* pertenciam a um único clone, identificado como clone de alto risco ST235.

3 OBJETIVO GERAL

Investigar a presença de genes de resistência aos beta-lactâmicos, o perfil epidemiológico e de susceptibilidade aos antimicrobianos utilizados na rotina clínica de amostras de *Pseudomonas aeruginosa* e *Acinetobacter baumannii* resistentes aos carbapenêmicos.

3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar o perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos utilizados na rotina clínica em todas as amostras do estudo;
- Determinar as concentrações mínimas inibitórias para os antimicrobianos colistina, polimixina B, imipenem, meropenem e ampicilina;
- Verificar a presença de genes codificadores das principais β -lactamases;
- Investigar a diversidade clonal das amostras bacterianas em questão.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 AMOSTRAS BACTERIANAS

As amostras bacterianas utilizadas neste estudo consistem em 41 isolados clínicos de bacilos Gram-negativos não fermentadores (BGN-NF), sendo 26 de *Acinetobacter baumannii* e 15 de *Pseudomonas aeruginosa* resistentes aos carbapenêmicos. As coletas foram realizadas no período de abril a novembro de 2014 em 10 hospitais da Grande Vitória. Os isolados foram obtidos de diferentes materiais clínicos, listados na Tabela 3. Todas as amostras do presente trabalho foram encaminhadas, pelos hospitais de origem, para o Laboratório Central do Espírito Santo (LACEN - ES) da Secretaria Estadual de Saúde - ES para serem identificadas e, em seguida, destinadas ao Laboratório de Biologia Molecular de Virulência Bacteriana, do Departamento de Patologia do Centro de Ciências da Saúde da UFES.

Tabela 3. Amostras bacterianas utilizadas no estudo, suas respectivas fontes de isolamento e local de origem.

| Espécie (n° de amostras) | Fonte de isolamento (n° de amostras) | Hospital (n° de amostras) |
|-------------------------------------|--|---|
| <i>Acinetobacter baumannii</i> (26) | Aspirado traqueal (6) Secreção traqueal (5) Swab de ferida sacral (3) Urina (2) Fragmento de tecido ósseo (2) Ponta de cateter (2) Fragmento da região glútea (1) Lavado bronco alveolar (1) Swab de cistostomia (1) Swab de ferida do membro inferior esquerdo (1) Swab nasal (1) Tecido abdominal (1) | 04 Hospitais Públicos (22) 03 Hospitais Privados (4) |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (15) | Urina (4) Sangue (2) Lavado bronco-alveolar (2) Aspirado traqueal (1) Ferida abdominal (1) Fragmento de tecido ósseo (1) Ponta de cateter (1) Secreção de ferida do trocânter (1) Swab de ferida sacral (1) Swab de secreção de ouvido (1) | 04 Hospitais Públicos (9) 03 Hospitais Privados (6) |

4.2 DETERMINAÇÃO DO PERFIL DE SUSCEPTIBILIDADE AOS ANTIMICROBIANOS

Para avaliar a susceptibilidade das amostras de *P. aeruginosa* e *A. baumannii* aos antimicrobianos foi realizado o método de difusão em ágar a partir do disco, de acordo com as normas estabelecidas pelo Comitê Brasileiro de Testes de Susceptibilidade Antimicrobiana (BrCAST-2016).

Os antimicrobianos testados para as amostras de *A. baumannii* foram: imipenem (10µg), meropenem (10µg), gentamicina (10µg), tobramicina (10µg), amicacina (30µg), ciprofloxacino (5µg), levofloxacino (5µg) e sulfametoxazol-trimetoprim (25 µg) e os antimicrobianos testados para as amostras de *P. aeruginosa* foram: imipenem (10µg), meropenem (10µg), piperaciclina-tazobactam (30µg), ticarcilina e ácido clavulânico (85 µg), cefepima (30 µg), ciprofloxacina

(5µg), levofloxacin (5µg), amikacin (30µg), gentamicin (10µg) e tobramycin (10µg).

O procedimento iniciou-se com a semeadura das amostras em ágar sangue e incubação a 35°C durante 18-24 h. Posteriormente, as colônias foram diluídas em solução salina 0,9% (p/v) até atingir um padrão de turvação de 0,5 da escala McFarland, correspondendo a, aproximadamente, $1,5 \times 10^8$ UFC/mL. Essa solução, por sua vez, foi semeada em ágar Muller-Hinton (Oxoid®, Reino Unido) com o auxílio de um *swab* a fim de se obter um crescimento homogêneo em toda superfície do ágar. Após 15 minutos, foram aplicados os discos de antibióticos, mantendo-se um espaço de, no mínimo, 2,5 cm entre eles. Após a aplicação dos discos, as placas foram incubadas a 35°C por 16-18h. Posteriormente, foi feita a medida dos diâmetros dos halos de inibição para cada antibiótico, com auxílio de uma régua.

Para a interpretação dos testes de susceptibilidade aos antimicrobianos foram utilizados os critérios preconizados no BrCAST, 2017.

4.3 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM)

A determinação da concentração inibitória mínima foi realizada para os antimicrobianos: colistina, polymyxin B, imipenem, meropenem, e amikacin através de tiras com concentrações crescentes do antimicrobiano (E-test® - BioMérieux, França), segundo instruções do fabricante.

Para realizar os testes as amostras foram semeadas em ágar sangue por 18-24h, a 35 °C e posteriormente foram retiradas de uma a duas colônias que foram então diluídas em salina 0,9% (p/v) para obtenção do padrão de turvação 0,5 da escala de McFarland ($1,5 \times 10^8$ UFC/mL). Com o auxílio de um *swab* estéril, essa solução foi semeada uniformemente em toda superfície de uma placa grande contendo ágar Mueller-Hinton (Oxoid®, Reino Unido). Foram empregadas tiras de E-test® (BioMérieux, França) que possuem concentrações distintas, que variam de acordo com cada antimicrobiano, possibilitando a determinação da concentração mínima inibitória. Posteriormente, as placas foram incubadas por 24h à 35 °C e a leitura do teste foi realizada de acordo com os valores estabelecidos pelo BrCAST 2017 (Tabela 4).

Tabela 4. Pontos de corte estabelecidos pelo BrCAST (2017) para os antimicrobianos testados.

| Antimicrobiano | Ponto de corte (µg/mL) | |
|----------------|------------------------|----------------------|
| | <i>A. baumannii</i> | <i>P. aeruginosa</i> |
| Amicacina | S≤8 | S≤8 |
| | R>16 | R>16 |
| | I=16 | I=16 |
| Colistina | S≤2 | S≤2 |
| | R>2 | R>2 |
| Imipenem | S≤2 | S≤4 |
| | R>8 | R>8 |
| | I=4-8 | I=8 |
| Meropenem | S≤2 | S≤2 |
| | R>8 | R>8 |
| | I=4-8 | I=4-8 |
| Polimixina B | S≤2 | S≤2 |
| | R>2 | R>2 |

S: Sensível; R: Resistente; I: Intermediário

4.4 PESQUISA DOS GENES CODIFICADORES DE BETA-LACTAMASES ATRAVÉS DA TÉCNICA DE REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR)

O DNA bacteriano foi extraído utilizando o *kit Wizard® Genomic DNA Purification* (Promega, Estado Unidos), segundo as informações do fabricante. Primeiramente, as amostras foram semeadas em ágar sangue e incubadas por 24h/48h. Após isso, transferiu-se duas a três colônias da amostra para um tubo contendo caldo TSB (Oxoid®) e deixou-se incubar por 24h. Depois do crescimento, 1 mL dessa suspensão foi adicionada a um microtubo de 1,5 mL e centrifugada a 1.200 rpm por dois minutos, para sedimentar as células e, posteriormente, foi retirado o sobrenadante. Adicionou-se ao microtubo 600µL de *Nuclei Lysis Solution* deixou-se incubar a 80°C por cinco minutos para a lise celular. Após a lise, foram adicionados 3µL de *RNase Solution* e o lisado celular foi incubado a 37°C por 40 minutos. Deixou-se esfriar e adicionou-se 200 µL de *Protein Precipitation Solution*, deixando incubar no gelo por cinco minutos e, após isso centrifugou-se a 1200 rpm por três minutos. O sobrenadante contendo o DNA

foi transferido para outro microtubo contendo 600 µL de isopropanol e homogeneizado até se observar uma massa visível. Posteriormente, centrifugou-se a 1200 rpm por dois minutos e descartou-se o sobrenadante cuidadosamente para não perder o *pelet* com DNA. Foram adicionados 600 µL de etanol 70% para lavar o DNA, e após centrifugar novamente, o etanol foi retirado e adicionou-se 100 µL de *DNA Rehydration Solution* ao tubo para reidratar o DNA e deixou-se incubar a 65°C por 1h e 30 minutos. O DNA extraído foi mantido em geladeira a 4° C para realização de testes moleculares.

Após a extração do DNA, foram realizadas reações de PCR para verificar a presença de genes codificadores de beta-lactamases. As condições de amplificação e a escolha dos genes pesquisados estão descritas nas Tabelas 5 e 6.

Tabela 5. Sequência dos iniciadores, temperatura de anelamento e tamanho dos produtos das reações em cadeia da polimerase para a detecção dos genes de beta-lactamases.

| Iniciadores | Gene alvo | Sequência | Temperatura de hibridização | Tamanho do amplicon | Referência |
|------------------------|------------------|--|-----------------------------|---------------------|--|
| IMP-F IMP-R | <i>blaIMP</i> | GGAATAGAGTGGCTTAAYTCTC GGTTTAAYAAAACAACCACC | 52 °C | 232 pb | (Poirel et al., 2011) |
| VIM-F VIM-R | <i>blaVIM</i> | GATGGTGTGTTGGTCGCATA CGAATGCGCAGCACCAG | 52 °C | 390 pb | (Poirel et al., 2011) |
| GIM-F GIM-R | <i>blaGIM</i> | TCGACACACCTTGGTCTGAA AACTTCCAACCTTGCCATGC | 52 °C | 477 pb | (Poirel et al., 2011) |
| SPM-F SPM-R | <i>blaSPM</i> | AAAATCTGGGTACGCAAACG ACATTATCCGCTGGAACAGG | 52 °C | 271 pb | (Poirel et al., 2011) |
| SIM-F SIM-R | <i>blaSIM</i> | TACAAGGGATTTCGGCATCG TAATGGCCTGTTCCCATGTG | 52 °C | 570 pb | (Poirel et al., 2011) |
| NDM-F NDM-R | <i>blaNDM</i> | GGTTTGGCGATCTGGTTTTTC CGGAATGGCTCATCACGATC | 52 °C | 621 pb | (Poirel et al., 2011) |
| DIM-F DIM-R | <i>blaDIM</i> | GCTTGCTCTTCGCTTGCTAACG CGTTCGGCTGGATTGATTTG | 52 °C | 699 pb | (Poirel et al., 2011) |
| FIM-F FIM-R | <i>blaFIM</i> | GAAGCACATGGAAAACCTGGG GATGGGCGAATGAGACAGC | 52 °C | 435 pb | (Poirel et al., 2011) |
| GES-F GES-R | <i>blaGES</i> | ATGCGCTTCATTACGCAC CTATTTGTCCGTGCTCAGG | 56 °C | 844 pb | (Neyestanaki et al., 2014) |
| PSE-F PSE-R | <i>blaPSE</i> | AATGGCAATCAGCGCTTC GCGCGACTGTGATGTATA | 48 °C | 698 pb | (Neyestanaki et al., 2014) |
| PER-F PER-R | <i>blaPER</i> | GGGACARTCSKATGAATGTCA GGYSGCTTAGATAGTGCTGAT | 47 °C | 926 pb | (Neyestanaki et al., 2014) |
| KPC-F KPC-R | <i>blaKPC</i> | CGTCTAGTTCTGCTGTCTTG CTTGTCATCCTTGTTAGGCG | 52 °C | | (Poirel et al., 2011) |
| TEM-F TEM-R | <i>blaTEM</i> | CTTCCTGTTTTTGCTCACC AGCAATAAACCCAGCCAGC | 54 °C | 636 pb | (Neyestanaki et al., 2014) |
| CTX M2-F CTX M2-R | <i>blaCTXM2</i> | CGTTAACGGCAGCATGAC CGATATCGTTGGTGGTRCCAT | 60 °C | 404 pb | (Dallenne et al., 2010) |
| OXA I-F OXA I-R | <i>blaOXAI</i> | TCAACAAATCGCCAGAGAAG TCCCACACCAGA AAA ACCAG | 57 °C | 276 pb | (Bert, Branger, Lambert-Zechovsky, 2002) |
| OXA II-F OXA II-R | <i>blaOXAI</i> | AAGAAACGCTACTCGCCTGC CCTCAACCCATCCTACCC | 57 °C | 478 pb | (Bert, Branger, Lambert-Zechovsky, 2002) |
| OXA III-F OXA III-R | <i>blaOXAI</i> | TTTTCTGTTGTTTGGGTTTT TTTCTTGGCTTTTATGCTTG | 57 °C | 427 pb | (Bert, Branger, Lambert-Zechovsky, 2002) |
| OXA 23-F OXA 23-R | <i>blaOXA23</i> | GATCGGATTGGAGAACCAA ATTTCTGACCGCATTTCCAT | 52 °C | 501 pb | (Woodford et al., 2006) (Brown, Young, Amyes, 2005) |
| OXA 24-F OXA 24-R | <i>blaOXA24</i> | GGTTAGTTGGCCCCCTTAA AGTTGAGCGAAAAGGGGATT | 52 °C | 246 pb | (Woodford et al., 2006) (Brown et al., 2005) |
| OXA 48-F | <i>blaOXA-48</i> | GCGTGGTTAAGGATGAACAC | 52 °C | 438 pb | (Poirel et al., 2011) |

| | | | | | |
|----------------------|-------------------|--|-------|--------|---|
| OXA 48-R | | CATCAAGTTCAACCCAACCG | | | |
| OXA-51-F OXA 51-R | <i>bla</i> OXA-51 | TAATGCTTTGATCGGCCTTG TGGATTGCACTTCATCTTGG | 52 °C | 353 pb | (Woodford et al., 2006) (Brown et al., 2005) |
| OXA 58-F OXA 58-R | <i>bla</i> OXA-58 | AAGTATTGGGGCTTGTGCTG CCCCTCTGCGCTCTACATAC | 52 °C | 599 pb | (Woodford et al., 2006) (Brown et al., 2005) |

Tabela 6: Condições específicas para a detecção dos genes utilizados nas reações de PCR multiplex e simples.

| Reação | Genes detectados | Concentração de cada primer (µM) | Preparo da PCR | Condições da amplificação |
|---------------|--|----------------------------------|---|---|
| Multiplex I | DIM-1 SIM-1 GIM-1 FIM-1 | 10 for 10 rev | Buffer 1X; 2U taq polimerase; 3,0mmol/L MgCl ₂ ; 0,125mmol/L dNTPS | Desnaturação inicial: 94°C/10 min 36 ciclos - Amplificação: 94°C/30 seg; Anelamento: 52°C/40seg Extensão: 72°C/50 seg; extensão final: 72°C/5 min |
| Multiplex II | IMP-1 VIM-2 SPM-1 | 10 for 10 rev | Buffer 1X; 2U taq polimerase; 1,5mmol/L MgCl ₂ ; 0,125mmol/L dNTPS | Desnaturação inicial: 94°C/10 min 36 ciclos - Amplificação: 94°C/30 seg; Anelamento: 52°C/40 seg Extensão: 72°C/50 seg; extensão final: 72°C/5 min |
| Multiplex III | NDM-1 KPC-2 OXA-48 | 10 for 10 rev | Buffer 1X; 2U taq polimerase; 1,5mmol/L MgCl ₂ ; 0,125mmol/L dNTPS | Desnaturação inicial: 94°C/10 min 36 ciclos- Amplificação: 94°C/30 seg; Anelamento: 52°C/40 seg Extensão: 72°C/50 seg; extensão final: 72°C/5 min |
| Multiplex IV | OXA-23 - Subgrupo 1 OXA-24-Subgrupo 2 OXA-51 OXA-58 | 10 for 10 rev | Buffer 1X; 2U taq polimerase; 3,0mmol/L MgCl ₂ ; 0,125mmol/L dNTPS | Desnaturação inicial: 94°C/5 min 30 ciclos- Amplificação: 94°C/25 seg; Anelamento: 52°C/40 seg Extensão: 72°C/50 seg; extensão final: 72°C/6 min |
| Multiplex V | OXA-I: grupo OXA-10 OXA-II: grupo OXA-2 OXA-III: grupo OXA-1 | 0,5 for 0,5 rev | Buffer 1X; 2U taq polimerase; 1,5mmol/L MgCl ₂ ; 0,4 mmol/L dNTPS | Desnaturação inicial: 96°C/5 min 30 ciclos- Amplificação: 96°C/30 seg; Anelamento: 55°C 30 seg Extensão: 72°C/1 min; extensão final: 72°C/5 min |
| PCR-GES | GES-1 | 0,5 for 0,5 rev | Buffer 1X; 2U taq polimerase; 1,5mmol/L MgCl ₂ ; 0,2 mmol/L dNTPS | Desnaturação inicial: 95°C/5 min 30 ciclos-Amplificação: 95°C/1 min; Anelamento: 56°C/1 min Extensão: 72°C/1 min; extensão final: 72°C/5 min |
| PCR-TEM | TEM-1 | 0,5 for 0,5 ver | Buffer 1X; 2U taq polimerase; 1,5mmol/L MgCl ₂ ; 0,2 mmol/L dNTPS | Desnaturação inicial: 95°C/5 min 30 ciclos- Amplificação: 95°C/1 min; Anelamento: 54°C/1 min Extensão: 72°C/1 min; extensão final: 72°C/5 min |
| PCR-PER | PER-1 | 0,5 for 0,5 ver | Buffer 1X; 2U taq polimerase; 1,5mmol/L MgCl ₂ ; 0,2 mmol/L dNTPS | Desnaturação inicial: 95°C/5 min 30 ciclos- Amplificação: 95°C/1 min; Anelamento: 47°C/1 min Extensão: 72°C/1 min; extensão final: 72°C/5 min |
| PCR-PSE | PSE-1 | 0,5 for 0,5 rev | Buffer 1X; 2U taq polimerase; 1,5mmol/L MgCl ₂ ; 0,2 mmol/L dNTPS | Desnaturação inicial: 95°C/5 min 30 ciclos- Amplificação: 95°C/1 min; anelamento: 48°C/1 min Extensão: 72°C/1 min; extensão final: 72°C/5 min |

A amplificação do DNA genômico pela técnica de PCR foi visualizada através de eletroforese em gel de agarose a 2% (*Hy agarose- ACTgene*, Brasil) em TBE 1X (Tris 0,89 M, ácido bórico 0,89 M, EDTA 2,5 mM, pH 8,2). A eletroforese foi realizada com tampão de corrida TBE 0,5X sob uma corrente de 100 V por 120 minutos. Após a corrida eletroforética o gel foi corado com brometo de etídio (0,5 g/L) (Hexapur, Holanda) e observado sob luz ultravioleta no equipamento MiniBIS Pro (*Bio-Imaging Systems*, Israel)

4.5 ANÁLISE DO POLIMORFISMO GENÉTICO ATRAVÉS DA FRAGMENTAÇÃO DO DNA GENÔMICO E ELETROFORESE EM GEL DE CAMPO PULSADO (PFGE)

A análise do polimorfismo genético das amostras incluídas nesta pesquisa foi realizada através da fragmentação do DNA genômico, utilizando a enzima de restrição *SpeI* para *P. aeruginosa* e *Apal* para *A. baumannii*, sendo o DNA fragmentado submetido a eletroforese em gel de campo pulsado segundo Durmaz et al., 2009.

Para realizar a extração de DNA total, as amostras foram semeadas em ágar-sangue (Oxoid®) e incubadas a 35°C por 24 horas. Após obter um crescimento bacteriano puro, as colônias foram suspensas em 1 mL de tampão CSB (EDTA 0,5M, TRIS-HCl 1M pH 8) até alcançar o padrão de turvação 4,0 da escala de MacFarland (12×10^8 UFC/mL). Em seguida, 200 µL da suspensão foram transferidos para um microtubo e foram adicionados, à suspensão de células, 200 µL de agarose 2% em CSB (agarose *low melting analytical*-Promega, Estados Unidos, e SDS 1%). A mistura foi homogeneizada e distribuída em moldes.

Após a solidificação dos blocos de agarose contendo DNA bacteriano (*plugs*), os mesmos foram transferidos para tubos do tipo falcon estéreis contendo 500 µL de solução CLS-1 (EDTA 0,5M pH 8, TRIS-HCl 1M pH 8), 25 µL lisozima (50 mg/ µL) e 15 µL de Proteinase K (50 mg/µL) e incubados a 37° C por 1 hora. Após a incubação, foi removida a solução de lise e adicionados 500 µL da solução CLS-2 (EDTA 0,5M e sarcosil) e em seguida adicionado 4 µL de proteinase K (50 mg/ µL) e incubado a 55° C por 2 horas. Após isso, foi retirada toda a solução de

lise e os blocos foram lavados três vezes com 2 mL de água ultrapura estéril pré-aquecida (50°C), homogeneizado e incubado por 15 minutos a 50° C por três vezes com 2 mL de tampão TE pH 7,6 (TRIS-HCl 1M pH 7,5 e EDTA 0,5M pH 8, com ajuste do pH final para 7,6) a 50°C por 15 minutos. Foi removida toda a solução de lavagem e adicionados 3 mL de tampão TE.

Para a realização da digestão enzimática, um pedaço correspondente a, aproximadamente, um terço de um bloco foi transferido para um microtubo contendo 90 µL água ultra-pura estéril e 10 µL da solução tampão da enzima de restrição com BSA (1X) e incubada a 37° C por 30 minutos. Após a incubação, o tampão foi removido e adicionou-se 90 µL de água ultra-pura estéril, 10 µL de solução tampão 10X da enzima de restrição e 4 µL da enzima de restrição (40 U). Em seguida, foram incubadas a 37°C por 3 horas.

Os fragmentos de restrição foram separados em gel de agarose 1% (*pulsed field certified agarose* - Bio-Rad, Estados Unidos) preparado em TBE 0,5X (Tris – Borato - EDTA), através de eletroforese de campo pulsado, utilizando o sistema CHEF-DR III (Bio-Rad, Estados Unidos). Foram utilizadas as seguintes condições para a eletroforese: tempo de pulso crescente de 5 a 30 segundos, por 20 horas a 6 V/cm na temperatura de 14°C. Foram utilizados padrões de tamanho molecular DNA *Size Standard* (225-2200 Kb, *New England Biolabs*, Estados Unidos) nas corridas eletroforéticas.

Após as corridas, os géis foram corados com brometo de etídio (0,5 µg/mL) (Hexapur, Holanda), visualizados sob luz ultravioleta e fotografados, utilizando o equipamento de fotodocumentação MiniBIS Pro (*Bio-Imaging Systems*, Israel).

A análise dos genótipos foi realizada através de inspeção visual e foram classificadas de acordo com os critérios de Van Belkum (2007), onde amostras com até quatro bandas de diferença são agrupadas no mesmo pulsotipo e com padrão de bandas idêntico agrupadas no mesmo subtipo.

4.6 ANÁLISE DO POLIMORFISMO GENÉTICO ATRAVÉS DE *MULTILOCUS SEQUENCE TYPING* (MLST)

4.6.1 Amplificação por PCR

Após a determinação dos pulsotipos e subtipos das amostras de *P. aeruginosa* por PFGE, foram selecionadas cinco amostras de diferentes pulsotipos para a realização da tipagem molecular.

A PCR para detecção desses genes foi preparada em um volume final de 25 µL, sendo 1,5 µL de DNA cromossômico contendo, aproximadamente, 25 ng e 10 pmoles de cada oligonucleotídeo iniciador. Para as condições de amplificação dos genes foram utilizados 30 ciclos de um minuto a 96°C para desnaturação, um minuto a 55°C para anelamento e um minuto a 72°C para extensão, seguidos de uma extensão final de 10 min a 72°C. Após a amplificação por PCR, a quantificação aproximada dos fragmentos gerados foi realizada através de eletroforese em gel de agarose (Invitrogen, Estados Unidos) a 2% em TBE 0,5X, utilizando como marcador o *Low DNA Mass ladder* (Invitrogen, Estados Unidos). A eletroforese foi realizada com tampão de corrida TBE 0,5X sob uma corrente de 6V/cm por 1 hora. Após a corrida, o gel foi corado em solução de brometo de etídio (0,5 µg/mL) (Hexapur, Holanda) e sua imagem foi capturada em fotodocumentador ultravioleta (MiniBIS Pro- Uniscience, Brasil). Os oligonucleotídeos iniciadores específicos e genes alvos estão listados na Tabela 7.

Tabela 7: Oligonucleotídeos iniciadores específicos e genes alvos utilizados para realização das reações de PCR da técnica de *multilocus sequence typing* de *Pseudomonas aeruginosa*.

| Gene alvo | Oligonucleotídeos iniciadores | Amplicon (pb) |
|-------------|---|---------------|
| <i>acsA</i> | <i>acsA</i> -F ACCTGGTGTACGCCTCGCTGAC | 842pb |
| | <i>acsA</i> -R GACATAGATGCCCTGCCCCTTGAT | |
| <i>aroE</i> | <i>aroE</i> -F TGGGGCTATGACTGGAAACC | 825pb |
| | <i>aroE</i> -R TAACCCGGTTTTGTGATTCCTACA | |
| <i>guaA</i> | <i>guaA</i> -F CGGCCTCGACGTGTGGATGA | 940pb |
| | <i>guaA</i> -R GAACGCCTGGCTGGTCTTGTGGTA | |
| <i>mutL</i> | <i>mutL</i> -F CCAGATCGCCGCCGGTGAGGTG | 940pb |
| | <i>mutL</i> -R CAGGGTGCCATAGAGGAAGTC | |
| <i>nuoD</i> | <i>nuoD</i> -F ACCGCCACCCGTA CTG | 1042pb |
| | <i>nuoD</i> -R TCTCGCCCATCTTGACCA | |
| <i>PpsA</i> | <i>ppsA</i> -F GGTCGCTCGGTCAAGGTAGTGG | 989pb |
| | <i>ppsA</i> -R GGGTTCTCTTCTTCCGGCTCGTAG | |
| <i>trpE</i> | <i>trpE</i> -F GCGGCCAGGGTCGTGAG | 811pb |
| | <i>trpE</i> -R CCCGGCGCTTGTTGATGGTT | |

4.6.2 Sequenciamento

Os produtos da PCR foram purificados através do *kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System* (Promega, Estados Unidos). Os oligonucleotídeos iniciadores utilizados para o sequenciamento estão listados na Tabela 8.

Tabela 8: Oligonucleotídeos iniciadores utilizados para o sequenciamento da técnica de *multilocus sequence typing* de *Pseudomonas aeruginosa*

| Gene alvo | Oligonucleotídeos iniciadores | Amplicon (pb) |
|-------------|-------------------------------|---------------|
| <i>acsA</i> | acsA-F GCCACACCTACATCGTCTAT | 390pb |
| <i>aroE</i> | aroE-F ATGTCACCGTGCCGTTCAAG | 495pb |
| <i>guaA</i> | guaA-F AGGTCGGTTCCTCCAAGGTC | 372pb |
| <i>mutL</i> | mutL-F AGAAGACCGAGTTCGACCAT | 441pb |
| <i>nuoD</i> | nuoD-F ACGGCGAGAACGAGGACTAC | 366pb |
| <i>ppsA</i> | ppsA-F GGTGACGACGGCAAGCTGTA | 369pb |
| <i>trpE</i> | trpE-F TTCAACTTCGGCGACTTCCA | 441pb |

Os produtos purificados foram sequenciados no sequenciador ABI 3730 DNA Analyser (*Life Technologies- Applied Biosystems*, Estados Unidos), do Centro de Pesquisas sobre o Genoma Humano e Células-Tronco, no setor de sequenciamento de DNA na Universidade de São Paulo (USP). A análise das sequências obtidas foi realizada com auxílio do *software Chromas* (versão 2.6.1). Para a análise da composição das sequências obtidas foi utilizado o *BioEdit Sequence Alignment* Editor (versão 7.2.5). Posteriormente, essas sequências foram comparadas com as sequências já disponíveis no banco de dados de MLST de *P. aeruginosa* (https://pubmLst.org/bigadb?db=pubmLst_paeruginosa_seqdef) para a determinação de cada um dos números dos alelos e, consequentemente, a descrição de cada ST.

5 RESULTADOS

5.1 PERFIL DE SUSCEPTIBILIDADE AOS ANTIMICROBIANOS

5.1.1 *Acinetobacter baumannii*

A Figura 6 apresenta os perfis de susceptibilidade obtidos pelo teste de difusão a partir do disco para os oito antimicrobianos. Em relação às 26 amostras de *A. baumannii*, foi observado que todas apresentaram resistência à maioria dos antimicrobianos que foram testados. Quanto aos carbapenêmicos, apenas uma amostra apresentou-se sensível ao imipenem e outras duas sensíveis ao meropenem. Contudo, todas as amostras apresentaram resistência plena ou intermediária à pelo menos um carbapenêmico, sendo que 61,5% foram resistentes ao imipenem e 61,5% exibiram resistência intermediária ao meropenem. Todas as amostras foram resistentes à ciprofloxacina e 96,1% à levofloxacina, ambos pertencentes à classe das quinolonas. Em relação aos outros antimicrobianos testados, o perfil de resistência foi: 76,9% das amostras resistentes à gentamicina, 80,9% ao sulfametoxazol/trimetoprima, 50% à ampicacina e 73,1% à tobramicina.

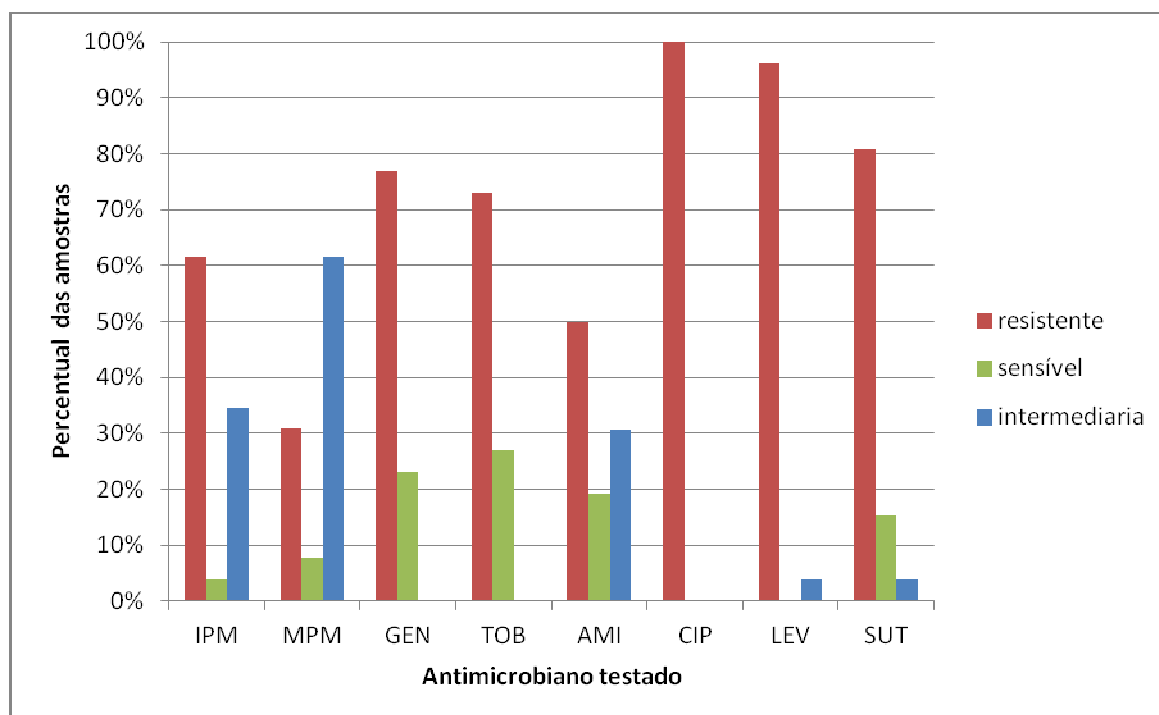


Figura 6: Perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos das 26 amostras de *Acinetobacter baumannii*. Legenda: IMP - Imipenem; MPM - Meropenem; GEN - Gentamicina; TOB - Tobramicina; AMI- Amicacina; CIP- Ciprofloxacina; LEV - Levofloxacina; SUT - Sulfametoxazol-trimetoprima.

5.1.2 *Pseudomonas aeruginosa*

Assim como as amostras de *A. baumannii*, todas as 15 amostras de *P. aeruginosa* se mostraram resistentes à maioria dos antimicrobianos que foram testados. Todas as amostras apresentaram resistência a ticarcilina e ácido clavulânico e resistência plena ou intermediária ao meropenem, enquanto que 61,5% (16 amostras) foram resistentes ao imipenem. Grande parte das amostras foram resistentes à ciprofloxacina (66,6%), à levofloxacina (80,0%), gentamicina (86,66%) e cefepima (80%). Os antimicrobianos que mostraram maior atividade nas amostras avaliadas foram: amicacina (33,3% amostras sensíveis), ceftazidima (40%), piperaciclina-tazobactam (46,6%), conforme mostra a Figura 7. A Figura 8 ilustra o teste de difusão a partir do disco.

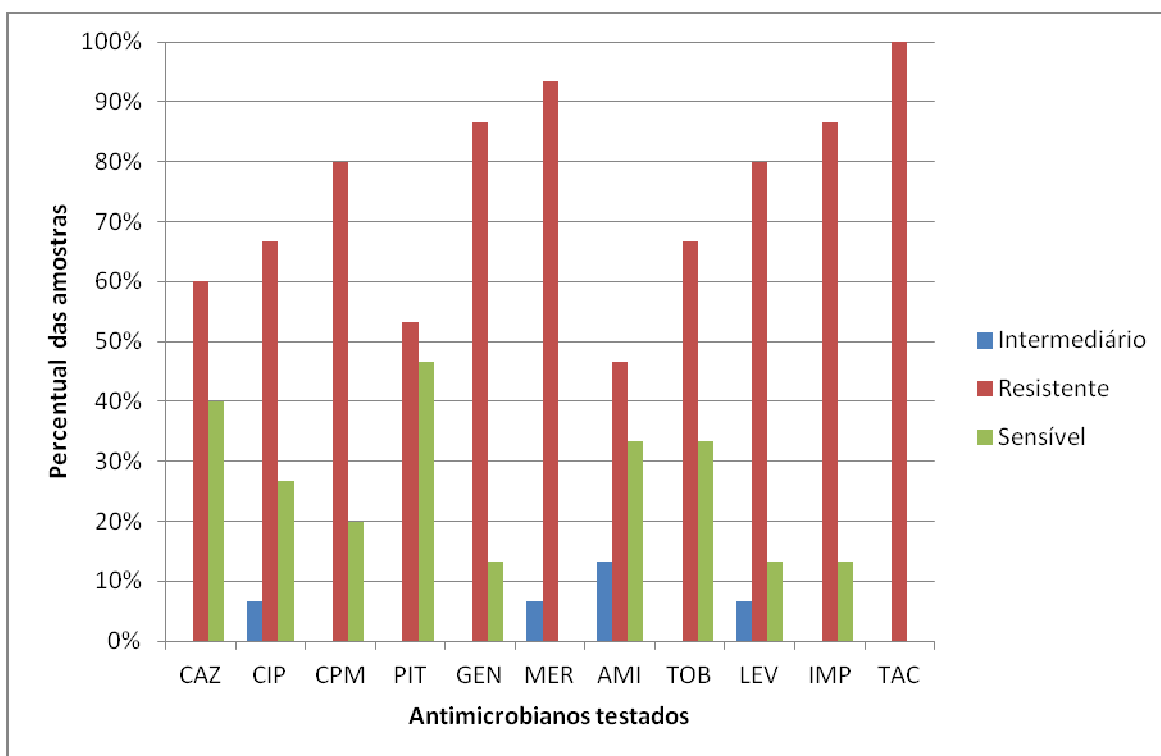


Figura 7. Perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos das 15 amostras de *Pseudomonas aeruginosa*. Legenda: CAZ - Ceftazidima; CIP - Ciprofloxacina; CPM - Cefepima; PIT - Piperacilina-tazobactam; GEN - Gentamicina; MER - Meropenem; AMI - Amicacina; TOB -Tobramicina; LEV - Levofloxacina; IMP - Imipenem; TAC - Ticarcilina e ácido clavulânico.

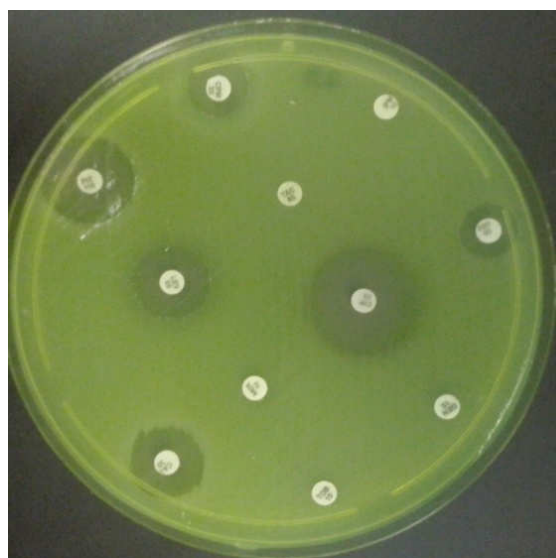


Figura 8. Imagem representativa do teste de difusão em ágar a partir do disco de uma amostra de *Pseudomonas aeruginosa*.

5.2 AVALIAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM) DAS AMOSTRAS DE *Pseudomonas aeruginosa* e *Acinetobacter baumannii*

As tabelas a seguir apresentam as variações das CIMs dos antimicrobianos analisados para todas as amostras de BGN-NF usadas neste estudo. Todas as 16 amostras de *P. aeruginosa* foram resistentes à pelo menos um dos carbapenêmicos testados, sendo 14 amostras resistentes ao meropenem e 13 amostras resistentes ao imipenem. Também foi observado que duas amostras apresentaram resistência à polimixina B, mas apesar de um perfil de multirresistência encontrado nestas amostras, todas se mostraram sensíveis à colistina e nove amostras foram sensíveis à amicacina, como mostra a Tabela 9. Conforme pode ser visto na Tabela 10, as 26 amostras de *A. baumannii* se mostraram resistentes aos carbapenêmicos meropenem e imipenem, sendo que grande parte das amostras apresentaram CIM ≥ 32 µg/mL. Todas as amostras foram sensíveis à polimixina B, porém, 34,6% (n=9) foram resistentes à colistina e 80,7% (n=21) à amicacina.

Tabela 9. Concentrações inibitórias mínimas (CIM) dos antimicrobianos nas 15 amostras de *Pseudomonas aeruginosa* analisadas neste estudo.

| Antimicrobianos | Concentrações inibitórias mínimas (µg/mL) | | | | | | | | | | | | | | |
|-----------------|---|------|------|-----|------|-----|-----|-----|----------|----------|-----|----------|-----------|----------|--------------|
| | (Total de amostras) | | | | | | | | | | | | | | |
| | 0,125 | 0,25 | 0,38 | 0,5 | 0,75 | 1,0 | 1,5 | 2,0 | 3,0 | 4,0 | 8,0 | 16,0 | 32,0 | 64,0 | $\geq 256,0$ |
| Amicacina | - | 1 | - | 1 | - | 1 | - | 3 | - | 3 | 1 | 2 | - | 1 | 2 |
| Meropenem | - | 1 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | 2 | 12 | - | - |
| Imipenem | - | - | - | - | - | 1 | - | - | - | 1 | - | 1 | 12 | - | - |
| Colistina | - | 1 | 1 | 3 | 3 | 3 | 2 | 2 | - | - | - | - | - | - | - |
| Polimixina B | - | - | 1 | 1 | 1 | 2 | 8 | | 1 | 1 | - | - | - | - | - |

* - os números em negrito representam as amostras dentro da faixa de resistência ou resistência intermediária, segundo o BrCAST (2017), de cada antimicrobiano.

Tabela 10: Concentrações inibitórias mínimas (CIM) dos antimicrobianos nas 26 amostras de *Acinetobacter baumannii* analisadas neste estudo.

| Antimicrobianos | Concentrações inibitórias mínimas (µg/mL) | | | | | | | | | | | | | | |
|-----------------|---|------|------|-----|------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|------|------|------|-------|
| | (Total de amostras) | | | | | | | | | | | | | | |
| | 0,125 | 0,25 | 0,38 | 0,5 | 0,75 | 1,0 | 1,5 | 2,0 | 3,0 | 4,0 | 8,0 | 16,0 | 32,0 | 64,0 | 128,0 |
| Amicacina | - | - | - | 1 | - | - | - | - | - | 2 | 2 | 4 | 17 | - | - |
| Meropenem | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | 2 | 13 | 11 | - |
| Imipenem | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | 10 | 12 | 4 |
| Colistina | - | - | - | 3 | - | 7 | - | 7 | - | 7 | 1 | 1 | - | - | - |
| Polimixina B | 3 | 12 | - | 10 | - | 1 | - | - | - | - | - | - | - | - | - |

* - os números em negrito representam as amostras dentro da faixa de resistência ou resistência intermediária, segundo o BrCAST (2017), de cada antimicrobiano

5.3 PESQUISA DOS GENES CODIFICADORES DE BETA-LACTAMASES ATRAVÉS DA TÉCNICA DE REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR)

A pesquisa dos genes codificadores das beta-lactamases IMP, VIM, SPM, NDM, KPC, OXA-48, OXA-23, OXA-24, OXA-51, OXA-58, OXA-I, OXA-II, OXA-III, TEM, PER, PSE, GES, DIM, SIM, FIM, GIM E CTXM-2 foi realizada em todas as 26 amostras de *A. baumannii* (Figura 9) e em todas as 15 amostras de *P. aeruginosa* (Figura 10).

Em *A. baumannii*, o gene intrínseco *bla*_{OXA-51} foi detectado em todos os 26 isolados estudados. Juntamente com este gene, foi detectado o gene *bla*_{OXA-23} em 92,3% (n=24) das amostras e, em 7,7% (n=2) dos isolados, os genes *bla*_{OXA-24} e *bla*_{OXA-48}. Nas amostras de *P. aeruginosa* não foi detectado nenhum destes genes. A presença do gene *bla*_{VIM} foi observada em 40% (n=6) dos isolados de *P. aeruginosa* e em 50% (n= 13) dos isolados de *A. baumannii*. Nas amostras de *P. aeruginosa* ainda foram detectados os genes *bla*_{OXA-I} (20%), *bla*_{OXA-II} (6,6%), *bla*_{IMP} (6,6%) e *bla*_{SPM} (20%).

Nenhuma das amostras dos BGN-NF analisadas apresentaram os genes *bla*_{NDM}, *bla*_{KPC}, *bla*_{OXA-III}, *bla*_{TEM}, *bla*_{OXA-58}, *bla*_{PER}, *bla*_{PSE}, *bla*_{GES}, *bla*_{GIM}, *bla*_{SIM}, *bla*_{DIM}, *bla*_{FIM} e *bla*_{CTXM-2}.

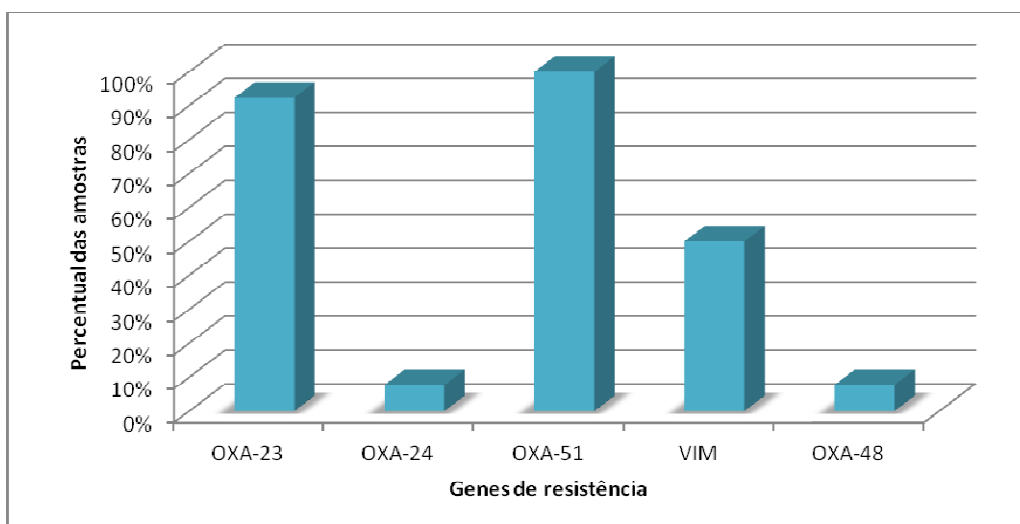


Figura 9: Presença dos genes codificadores de beta-lactamases nas 26 amostras de *Acinetobacter baumannii*.

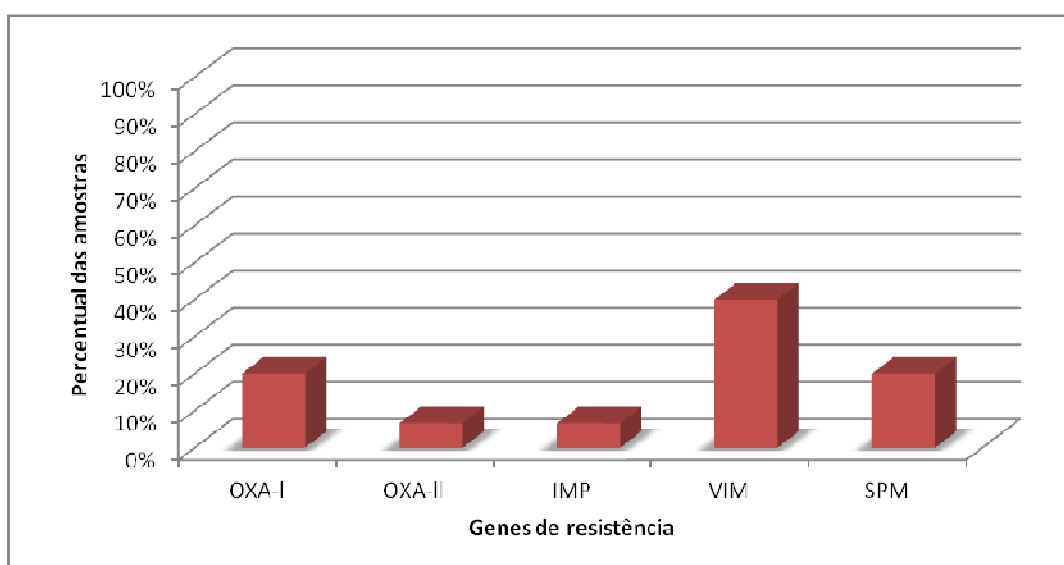


Figura 10: Presença dos genes codificadores de beta-lactamases encontrados nas 15 amostras de *Pseudomonas aeruginosa*.

As Tabelas 11 e 12 apresentam, respectivamente, os perfis das amostras de *A. baumannii* e *P. aeruginosa* em relação aos genes codificadores de beta-lactamases.

Tabela 11: Perfil da presença dos genes codificadores de beta-lactamases encontrados nas 26 amostras de *Acinetobacter baumannii*.

| Perfil genético de resistência | Número de amostras (%) | Genes codificadores de beta-lactamases | | | | |
|--------------------------------|------------------------|--|------------------------------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|
| | | <i>bla</i> _{VIM} | <i>bla</i> _{OXA-23} | <i>bla</i> _{OXA-24} | <i>bla</i> _{OXA-51} | <i>bla</i> _{OXA-48} |
| P1 | 12 (46,1%) | - | + | - | + | - |
| P2 | 10 (38,4%) | + | + | - | + | - |
| P3 | 1 (3,8%) | + | + | - | + | + |
| P4 | 1 (3,8%) | + | - | + | + | - |
| P5 | 1 (3,8%) | - | - | + | + | - |
| P6 | 1 (3,8%) | - | + | - | + | + |

Legenda: o símbolo “+” indica presença do gene codificador de beta-lactamase, enquanto que o símbolo “-” refere-se à ausência do mesmo.

Entre as amostras de *A. baumannii*, foram observados seis perfis genéticos diferentes. Conforme demonstra a Tabela 11, 12 amostras (46,1%) apresentaram o perfil genético P1, caracterizado por apresentar os genes *bla*_{OXA-23} e *bla*_{OXA-51}. O segundo perfil mais frequente (P2) continha os genes *bla*_{VIM}, *bla*_{OXA-23} e *bla*_{OXA-51} e os perfis P3, P4, P5 e P6 foram observados em apenas uma amostra cada.

Tabela 12: Perfil da presença dos genes codificadores de beta-lactamases encontrados nas 15 amostras de *Pseudomonas aeruginosa*.

| Perfil genético de resistência | Número de amostras (%) | Genes codificadores de beta-lactamases | | | | |
|--------------------------------|------------------------|--|---------------------------|-----------------------------|------------------------------|---------------------------|
| | | <i>bla</i> _{VIM} | <i>bla</i> _{SPM} | <i>bla</i> _{OXA-I} | <i>bla</i> _{OXA-II} | <i>bla</i> _{IMP} |
| P1 | 5 (33,3%) | + | - | - | - | - |
| P2 | 2 (13,3%) | - | + | + | - | - |
| P3 | 1 (6,6%) | - | - | - | - | + |
| P4 | 1 (6,6%) | - | - | + | - | - |
| P5 | 1 (6,6%) | + | - | - | + | - |
| P6 | 1 (6,6%) | - | + | - | - | - |
| P7 | 4 (26,6%) | - | - | - | - | - |

Legenda: o símbolo “+” indica presença do gene codificador de beta-lactamase, enquanto que o símbolo “-” refere-se à ausência do mesmo.

Analisando a presença de genes de resistência nas amostras de *P. aeruginosa*, foram encontrados sete perfis genéticos diferentes (Tabela 12). Cinco amostras apresentaram o perfil genético P1, caracterizado pela presença apenas do gene *bla_{VIM}*. O perfil genético P2 foi observado em duas amostras, sendo caracterizado pela presença dos genes *bla_{SPM}* e *bla_{OXA-1}*. O perfil genético P7 foi observado em quatro amostras, sendo caracterizado por não apresentar nenhum gene de resistência pesquisado nesse estudo.

A Figura 11 apresenta alguns dos genes encontrados nas amostras.

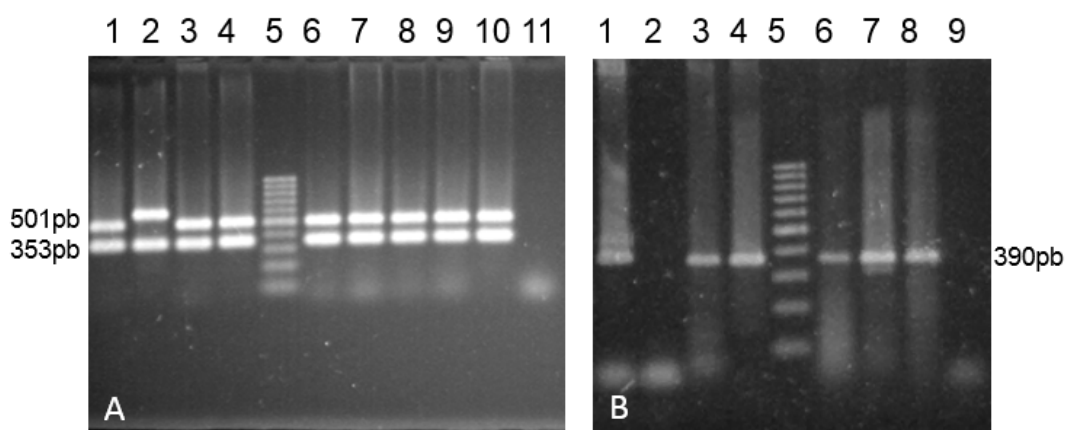


Figura 11: Foto representativa dos produtos de PCR para identificação dos genes codificadores de beta-lactamases. 11A: Amplificação dos genes *bla_{OXA-23}* e *bla_{OXA-51}* em amostras de *Acinetobacter baumannii*. Legenda: linha 5 - Marcador de tamanho molecular (100pb); linhas 1 e 2 - Controles positivos; linhas 3,4,6,7,8,9,10 - amostras albergando os genes *bla_{OXA-23}* e *bla_{OXA-51}*; linha 11 - Branco. 11B: Amplificação do gene *bla_{VIM}* em amostras de *Pseudomonas aeruginosa*. Legenda: linha 5 - Marcador de tamanho molecular (100pb); linhas 1 e 2 - controles positivo e negativo, respectivamente; linhas 3,4,6,7 e 8 - amostras albergando o gene *bla_{VIM}*; 9 - Branco.

5.4 ANÁLISE DO POLIMORFISMO GENÉTICO ATRAVÉS DA FRAGMENTAÇÃO DO DNA GENÔMICO E ELETROFORESE EM GEL DE CAMPO PULSADO (PFGE)

Entre os 26 isolados clínicos de *A. baumannii* foram identificados nove pulsotipos distintos, nomeados de abA a abl (Figuras 12 e 13). O pulsotipo abA apresentou o maior número de amostras (n=9) e foram observados dois subtipos

(A1 e A2), sendo oito amostras do subtipo A1 e uma amostra do subtipo A2. O segundo pulsotipo com maior número de amostras foi o abB (n=6) sendo encontrado três subtipos (B1, B2, B3), sendo quatro amostras do subtipo B1, uma amostra do subtipo B2 e uma amostra do subtipo B3. O pulsotipo abC inclui três amostras, sendo duas do subtipo C1 e uma o subtipo C2. Os pulsotipos abD e abE apresentaram duas amostras distintas cada e os demais pulsotipos apresentaram apenas uma amostra.

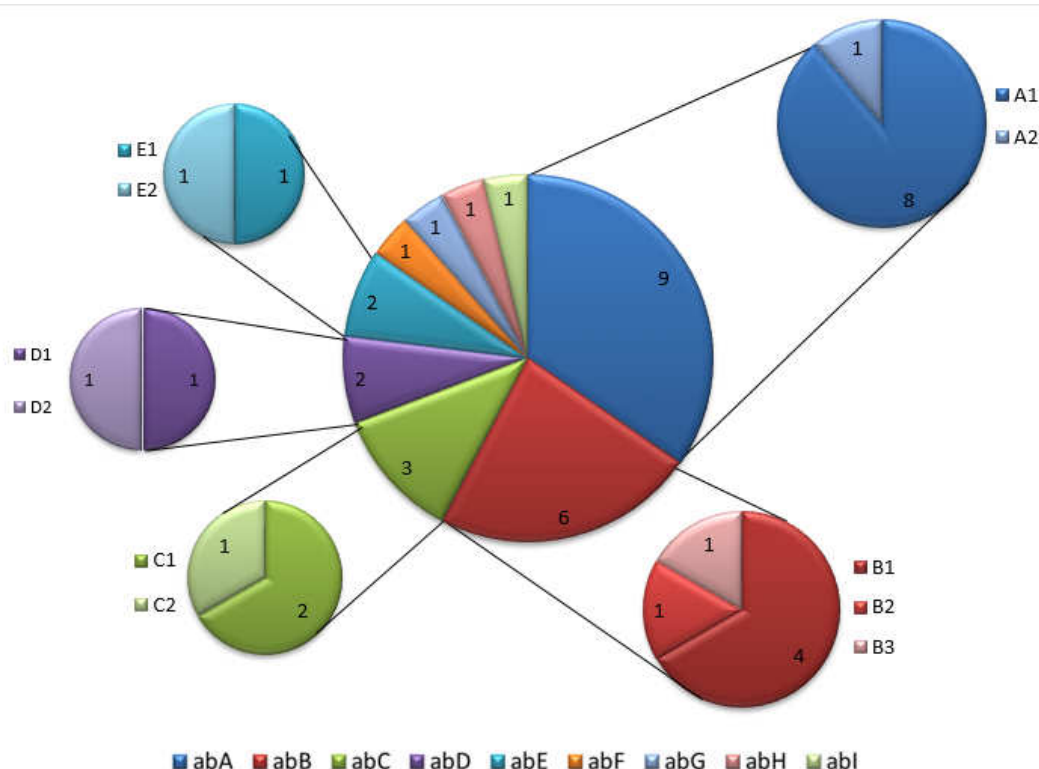


Figura 12. Pulsotipos das amostras de *Acinetobacter baumannii* obtidos por meio da análise do padrão de fragmentação do DNA cromossomal e separação por eletroforese de campo pulsado (PFGE). O número no interior do gráfico refere-se ao número de amostras com o referido pulsotipo/subtipo.

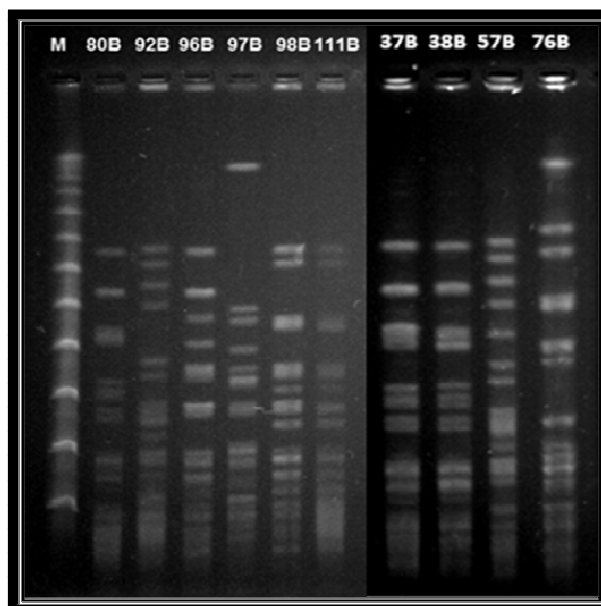


Figura 13. Foto representativa da eletroforese de campo pulsado (PFGE) evidenciando os padrões de fragmentação do DNA cromossômico das amostras de *Acinetobacter baumannii*. Legenda: M: Marcador de tamanho molecular; 80B, 92B, 96B, 98B, 111B, 37B, 38B, 57B, 76B: amostras de *Acinetobacter baumannii*.

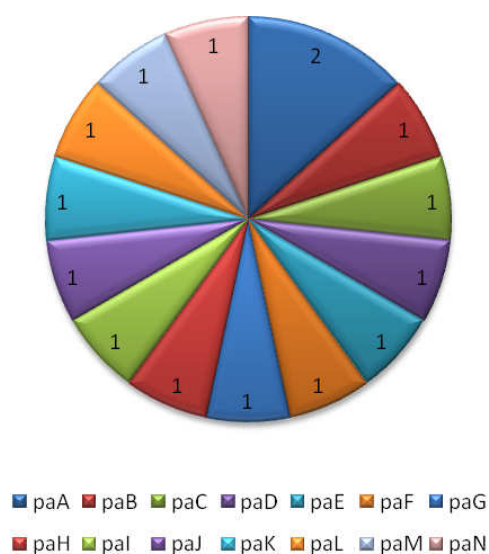


Figura 14. Pulsotipos das amostras de *Pseudomonas aeruginosa* obtidos por meio da análise do padrão de fragmentação do DNA cromossomal e separação por eletroforese de campo pulsado (PFGE). O número no interior do gráfico refere-se ao número de amostras com o referido pulsotipo.

A análise das amostras de *P. aeruginosa* revelou a presença de 14 pulsotipos distintos, nomeados de paA a paN. O pulsotipo paA apresentou duas

amostras e os demais pulsotipos apresentaram apenas uma amostra, conforme mostra a Figura 14. A Figura 15 ilustra alguns dos pulsotipos encontrados.

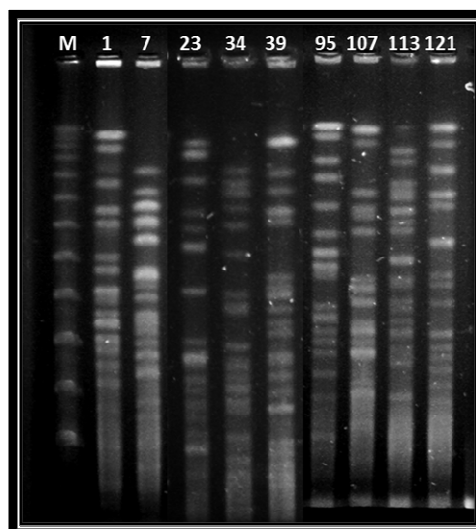


Figura 15. Foto representativa da eletroforese de campo pulsado (PFGE) evidenciando os padrões de fragmentação do DNA cromossômico das amostras de *Pseudomonas aeruginosa*. Legenda: M: Marcador de peso molecular; 1, 7, 23, 34, 39, 95, 107, 113, 121: amostras de *Pseudomonas aeruginosa*.

5.5 TIPAGEM MOLECULAR ATRAVÉS DO *MULTILOCUS SEQUENCE TYPING* (MLST)

Após a determinação dos pulsotipos e subtipos das amostras de *P. aeruginosa* por PFGE, foram selecionadas cinco amostras (23B, 68B, 77B, 93B, 107B) de diferentes pulsotipos para a realização da tipagem molecular por MLST, sendo que a amostra 23B alberga o gene *bla_{VIM}*, a amostra 68B alberga o gene *bla_{SPM}*, a amostra 77B alberga os genes *bla_{SPM}* e *bla_{OXA-I}*, a amostra 93B alberga o gene *bla_{IMP}* e a amostra 107B alberga o gene *bla_{OXA-I}*.

Através do MLST, foi identificado que cada amostra apresentou um perfil alélico diferente. Como demonstrado na Tabela 13, os “sequence types” (STs) encontrados foram 357, 2321, 1121, 244 e 227.

Tabela 13: Características genótípicas das amostras de *Pseudomonas aeruginosa*.

| Amostra | Pulsotipo | Subtipo | ST* | CC** | Perfil alélico | | | | | | |
|---------|-----------|---------|------|-----------------|----------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| | | | | | <i>acsA</i> | <i>aroE</i> | <i>guaA</i> | <i>mutL</i> | <i>nuoD</i> | <i>ppsA</i> | <i>trpE</i> |
| 68B | paA | A1 | 2321 | nd [#] | 39 | 5 | 9 | 21 | 27 | 5 | 2 |
| 107B | paB | B1 | 227 | 235 | 38 | 11 | 3 | 9 | 1 | 2 | 4 |
| 23B | paK | K1 | 357 | 357 | 2 | 4 | 5 | 3 | 1 | 6 | 11 |
| 77B | paM | M1 | 1121 | nd [#] | 67 | 50 | 65 | 31 | 1 | 6 | 26 |
| 93B | paN | N1 | 244 | 244 | 17 | 5 | 12 | 3 | 14 | 4 | 7 |

*ST – “sequence type”; **CC – complexo clonal; #nd – não descrito

5.6 RELAÇÃO ENTRE OS PULSOTIPOS E SUBTIPOS DE *Pseudomonas aeruginosa* e *Acinetobacter baumannii* DETECTADOS E A PRESENÇA DOS GENES CODIFICADORES DE BETA-LACTAMASES

A Tabela 14 apresenta a detecção dos genes codificadores de beta-lactamases (perfil genético de resistência) nos diferentes pulsotipos/subtipos encontrados nas amostras de *A. baumannii*.

Entre as amostras de *A. baumannii* foi observado que o pulsotipo mais frequente (abA) apresentou dois perfis genéticos de resistência (P1 e P2), sendo cinco amostras com o perfil P2 (*bla*_{VIM}+, *bla*_{OXA-23}+, *bla*_{OXA-51}+) e três amostras com perfil P1 (*bla*_{VIM}-, *bla*_{OXA-23}+, *bla*_{OXA-51}+) . O segundo pulsotipo mais frequente (abB) apresentou três perfis genéticos distintos (P1, P2, P6), sendo duas amostras com o perfil genético P2 (Tabela 14).

Pode-se observar que os pulsotipos abF, abG e abl, apesar de diferentes, apresentaram o mesmo perfil genético (P1), assim como os pulsotipos abD e abH, que apresentaram o perfil genético P2.

Tabela 14: Relação entre os pulsotipos e subtipos de *Acinetobacter baumannii* detectados e a presença dos genes codificadores de beta-lactamases

| Pulsotipo (N° de amostras) | Subtipo (N° de amostras) | Perfil (N° de amostras) | Genes codificadores de beta-lactamases | | | | |
|-------------------------------|-----------------------------|----------------------------|--|------------------|------------------|------------------|------------------|
| | | | <i>blaVIM</i> | <i>blaOXA-23</i> | <i>blaOXA-24</i> | <i>blaOXA-51</i> | <i>blaOXA-48</i> |
| abA(9) | A1(8) | P2(5) | + | + | - | + | - |
| | | P1(3) | - | + | - | + | - |
| | A2(1) | P1(1) | - | + | - | + | - |
| abB(6) | B1(4) | P2(2) | + | + | - | + | - |
| | | P1(1) | - | + | - | + | - |
| | | P6(1) | - | + | - | + | + |
| | B2(1) | P1(1) | - | + | - | + | - |
| | B3(1) | P3(1) | + | + | - | + | + |
| abC(3) | C1(2) | P1(1) | - | + | - | + | - |
| | | P2(1) | + | + | - | + | - |
| | C2(1) | P1(1) | - | + | - | + | - |
| abD(2) | D1(1) | P2(1) | + | + | - | + | - |
| | D2(1) | P2(1) | + | + | - | + | - |
| abE(2) | E1(2) | P4(1) | + | - | + | + | - |
| | | P5(1) | - | - | + | + | - |
| abF(1) | F1(1) | P1(1) | - | + | - | + | - |
| abG(1) | G1(1) | P1(1) | - | + | - | + | - |
| abH(1) | H1(1) | P2(1) | + | + | - | + | - |
| abl(1) | I1(1) | P1(1) | - | + | - | + | - |

Legenda: o símbolo “+” indica presença do gene codificador de beta-lactamase, enquanto que o símbolo “-” refere-se à ausência do mesmo.

A Tabela 15 apresenta a detecção dos genes codificadores de beta-lactamases (perfil genético de resistência) nos diferentes pulsotipos/subtipos encontrados nas amostras de *P. aeruginosa*.

Entre as amostras de *P. aeruginosa*, foi possível observar que o pulsotipo paA, apresentou dois perfis genéticos distintos: P2 (*bla*_{SPM}+, *bla*_{OXA-I}+) e P6 (*bla*_{SPM}+, *bla*_{OXA-I}-). As amostras com os pulsotipos paC, paE, paI, paK e paL apresentaram o mesmo perfil genético P1 (*bla*_{VIM}+) e as amostras com os pulsotipos paD, paF, paG e paH também apresentaram o mesmo perfil genético P7, caracterizado pela ausência dos genes pesquisados (Tabela 15).

Tabela 15: Relação entre os pulsotipos e subtipos de *Pseudomonas aeruginosa* detectados e a presença dos genes codificadores de beta-lactamases

| Pulsotipo (Nº de amostras) | Subtipo (Nº de amostras) | ST | Perfil (Nº de amostras) | Genes codificadores de beta-lactamases | | | | |
|-------------------------------|-----------------------------|------|----------------------------|--|---------------------------|-----------------------------|------------------------------|---------------------------|
| | | | | <i>bla</i> _{VIM} | <i>bla</i> _{SPM} | <i>bla</i> _{OXA-I} | <i>bla</i> _{OXA-II} | <i>bla</i> _{IMP} |
| paA(2) | A1(2) | 2321 | P2(1) | - | + | + | - | - |
| | | | P6(1) | - | + | - | - | - |
| paB(1) | B1(1) | 227 | P4(1) | - | - | + | - | - |
| paC(1) | C1(1) | - | P1(1) | + | - | - | - | - |
| paD(1) | D1(1) | - | P7(1) | - | - | - | - | - |
| paE(1) | E1(1) | - | P1(1) | + | - | - | - | - |
| paF(1) | F1(1) | - | P7(1) | - | - | - | - | - |
| paG(1) | G1(1) | - | P7(1) | - | - | - | - | - |
| paH(1) | H1(1) | - | P7(1) | - | - | - | - | - |
| paI(1) | I1(1) | - | P1(1) | + | - | - | - | - |
| paJ(1) | J(1) | - | P5(1) | + | - | - | + | - |
| paK(1) | K(1) | 357 | P1(1) | + | - | - | - | - |
| paL(1) | L(1) | - | P1(1) | + | - | - | - | - |
| paM(1) | M(1) | 1121 | P2(1) | - | + | + | - | - |
| paN(1) | N(1) | 244 | P3(1) | - | - | - | - | + |

Legenda: o símbolo "+" indica presença do gene codificador de beta-lactamase, enquanto que o símbolo "-" refere-se à ausência do mesmo.

6 DISCUSSÃO

A emergência e a disseminação da resistência aos antimicrobianos são problemas de grande relevância mundial, especialmente entre patógenos de importância clínica como os BGN-NF. Neste estudo, analisamos os dois mais relevantes representantes dessa classe: *P. aeruginosa* e *A. baumannii*. Esses micro-organismos são importante causa de infecções graves na prática hospitalar, afetando, principalmente, pacientes imunocomprometidos e aqueles submetidos a tratamentos cirúrgicos. São notáveis por sua resistência a múltiplos antimicrobianos e pela facilidade com que eles podem adquirir novos mecanismos de resistência (Enoch, Birkett, Ludlam, 2007).

No presente estudo, foi possível observar um perfil de multirresistência em todas as amostras de *A. baumannii* e *P. aeruginosa*. Nas amostras de *A. baumannii* destacou-se a resistência aos antimicrobianos da classe das fluoroquinolonas, onde se observou que todas as amostras foram resistentes à ciprofloxacina e 96,1% à levofloxacina. Esses dados são semelhantes aos observados por Chagas e colaboradores, que realizaram uma pesquisa com 155 isolados de *A. baumannii* provenientes de 11 Estados brasileiros e demonstraram que 99,4% dos isolados eram resistentes ao ciprofloxacina (Chagas et al., 2014). Nas amostras de *P. aeruginosa* destacou-se a resistência em representantes de três classes: quinolonas, aminoglicosídeos e cefalosporinas de quarta geração. Um estudo realizado em Uberlândia, no Brasil, com 69 isolados de *P. aeruginosa* resistentes aos carbapenêmicos mostrou dados semelhantes, onde 65,2% das amostras foram resistentes à cefepima, 69,6% à ciprofloxacina e 72,5% resistentes à gentamicina (Gonçalves et al., 2016).

Através da análise da concentração inibitória mínima, observou-se que as amostras de *P. aeruginosa* se mostraram sensíveis a importantes antimicrobianos utilizados na clínica, como a polimixina B e colistina, apesar de duas amostras apresentarem resistência à polimixina B. As amostras de *A. baumannii* apresentaram-se sensíveis à polimixina B, contudo, mostraram resistência à colistina, observada em nove amostras, e elevada resistência à amicacina, observada em 80,7% das amostras. Apesar de a maioria dos isolados de *A. baumannii* permanecer sensível à colistina, relatos de isolados resistentes a esse

antimicrobiano tem aumentado, especialmente, em amostras resistentes aos carbapenêmicos (Cai et al., 2012). A resistência às polimixinas em *A. baumannii*, está relacionada com o operon *pmrCAB*. Seus genes compõem um sistema de dois componentes, onde o *pmrB* é o sensor de histidina quinase e o *pmrA* é a proteína reguladora da resposta. Esse sistema controla a expressão do gene *pmrC* que é responsável pela adição de fosfoetanolamina ao lipídio A do LPS da parede celular bacteriana. Assim como em *P. aeruginosa*, mutações no gene *pmrB* promovem diminuição da sensibilidade às polimixina (Girardello, 2012). Entre os aminoglicosídeos, amicacina e tobramicina são agentes que apresentam atividade contra muitos isolados de *A. baumannii*. Estudos realizados em isolados clínicos no Rio de Janeiro, Mato Grosso do Sul, Alagoas, Amazonas, Distrito Federal, Bahia, Santa Catarina, Espírito Santo, Goiás e Minas Gerais, no Brasil, também demonstram uma alta taxa de sensibilidade à amicacina nesta espécie (Carvalho et al., 2009; Chagas et al., 2014). Contudo, há relatos de amostras resistentes aos aminoglicosídeos, como mostra um estudo realizado com 118 amostras em Joinville, Brasil, onde observou-se que 80,5% dos isolados eram resistentes à amicacina (Cortivo et al., 2015). Outra pesquisa realizada na Itália, no período de 2008-2011, observou que todos os isolados estudados (26) eram resistentes à amicacina (Agodi et al., 2014). Essa resistência se deve, entre outros fatores, à capacidade de *A. baumannii* produzir várias enzimas modificadoras de aminoglicosídeos. Outro mecanismo de resistência que está emergindo é a produção de RNA metiltransferase ribossomal 16S, especialmente ArmA. A ArmA metila um resíduo de guanina no sítio de ligação do aminoglicosídeo (sítio A) do RNAr 16S e protege-o dos aminoglicosídeos (Doi et al., 2015).

Os carbapenêmicos apresentam amplo espectro de atividade e são, em muitos casos, o tratamento de escolha para pacientes com infecções hospitalares graves ou para aquelas infecções causadas por micro-organismos resistentes às penicilinas e cefalosporinas disponíveis, devido à sua alta afinidade pelas proteínas ligadoras de penicilina do tipo 2 (PBP2) e estabilidade frente a muitas beta-lactamases (Gales et al., 2002; Quale et al., 2003; Jones et al., 2005). Contudo, o surgimento de patógenos multirresistentes ameaça seriamente o uso dessa classe de medicamentos (Papp-Wallace et al., 2011), sendo importante

buscar novas opções terapêuticas para pacientes com infecções por micro-organismos resistentes à esse fármaco. Uma alternativa terapêutica comum quando ocorre falha no tratamento com os carbapenêmicos é o uso das polimixinas (colistina e polimixina B) e da tigeciclina no caso de infecção por *A. baumannii*, pois esse fármaco não possui boa atividade contra a *P. aeruginosa* (Girardello et al., 2012; Gan et al., 2012).

No presente estudo foram pesquisados 22 genes codificadores de beta-lactamases nas amostras de *A. baumannii* e *P. aeruginosa*, abrangendo as beta-lactamases de espectro estendido, metalo-beta-lactamases e carbapenemases. Analisando os resultados, observou-se que o perfil genético P1 (presença dos genes *bla_{OXA-51}* e *bla_{OXA-23}*) foi prevalente nas amostras de *A. baumannii*. Esses resultados são semelhantes a diversos estudos que relatam uma prevalência do gene *bla_{OXA-23}* em amostras dessa espécie obtidas em diferentes partes do mundo (Feizabadi et al., 2008; Gales et al., 2012; Antonio et al., 2011; Sohrabi et al., 2012). Um estudo realizado por Vasconcelos e colaboradores em nove hospitais distribuídos nas cinco regiões do Brasil, no período de abril a agosto de 2014, demonstrou que de 46 isolados de *A. baumannii*, 69,6% apresentavam o gene *bla_{OXA-23}* (Vasconcelos et al., 2015). Outro estudo realizado em Santa Catarina com 118 isolados de *A. baumannii* resistentes aos carbapenêmicos, demonstrou que 87,3% dessas amostras carregavam esse gene (Cortivo et al., 2015). Também corroboram nossos resultados os dados por Chagas e colaboradores, que realizaram uma pesquisa com 155 isolados de *A. baumannii* provenientes de 11 Estados brasileiros e observaram que 94,2 % dos isolados apresentavam o gene *bla_{OXA-23}* (Chagas et al. 2014). Esses dados vêm mostrando que este perfil genético é bastante prevalente no Brasil entre isolados desta espécie. Estudos indicam a elevação das CIMs quando há aumento na expressão de *bla_{OXA-51}* e também demonstram que isolados dessa espécie se tornam resistentes aos carbapenêmicos ao adquirirem plasmídeos carregando genes do grupo OXA, como o *bla_{OXA-23}*, *bla_{OXA-143}* entre outros (Turton et al., 2006; Figueiredo et al., 2009; Higgins et al., 2013).

Em nossa pesquisa foi observado que o gene *bla_{VIM}* estava presente em 50% dos isolados de *A. baumannii*. Esses dados são contraditórios ao que se observa na literatura. A presença do gene *bla_{VIM}* é detectada raramente em

amostras de *A. baumannii*. Há relatos da detecção deste gene, principalmente da variante *bla_{VIM-1}*, em alguns países, como na Grécia, Turquia, Alemanha e Coréia (Poirel, 2006; Tsakris et al., 2006; Beris et al. 2016). Esse fato pode caracterizar um perfil específico das amostras circulantes em nossa região.

Em *A. baumannii* as enzimas carbapenemases são, geralmente, do tipo OXA carbapenemases (oxacilinasas). Contudo, em *P. aeruginosa*, um dos principais mecanismos de resistência aos carbapenêmicos é a produção de metalo-beta-lactamases. Nosso estudo revelou a presença de três genes codificadores de metalo-beta-lactamase em *P. aeruginosa*: *bla_{IMP}* (6,6%), *bla_{SPM}* (20%) e *bla_{VIM}* (40%). A presença do gene *bla_{VIM}*, especialmente das variantes *bla_{VIM-1}* e *bla_{VIM-2}* é bem reportada em muitos países, incluindo países da América Latina e Brasil (Zafer et al, 2015; Perez et al., 2008; Polotto et al., 2012; Quinones-Falconi et al., 2010; Sader et al., Fehlberg et al., 2012; Franco et al., 2010; Marra et al., 2006, 2011; Martins et al., 2007; Picão et al., 2009; Moosavian et al., 2014). Um estudo realizado em Belo Horizonte, no Brasil, com 40 isolados clínicos de *P. aeruginosa*, verificou a presença do gene *bla_{VIM-1}* em 87,5% das amostras (Gonçalves et al., 2014). A produção de metalo-beta-lactamase SPM-1 tem sido o mecanismo mais comum de resistência aos carbapenêmicos identificado em *P. aeruginosa* isoladas de centros médicos brasileiros. Curiosamente, um único clone produtor de SPM-1, pertencente ao ST277 que tem sido amplamente difundido no território brasileiro (Nascimento et al., 2016). O gene *bla_{SPM}* foi reportado pela primeira vez na cidade de São Paulo, em 1999, isolado de *P. aeruginosa* que causou uma infecção fatal (Toleman et al., 2002). No Brasil, em 2006, um estudo realizado no Rio de Janeiro, relatou a ocorrência de uma epidemia onde observou-se a presença de SPM-1 em 20% de linhagens de *P. aeruginosa* resistentes ao imipenem (Carvalho et al., 2006). Outro estudo, realizado com 44 amostras de BGN-NF em um hospital de São Paulo, em 2009, verificou que 72,7,% eram produtores de MBL, sendo 31,23% apresentando SPM-1 e 68,7% apresentando IMP-1 (Picão et al., 2009). Na cidade do Paraná, um estudo feito com 136 isolados clínicos de *P.aeruginosa* observou a presença do gene *bla_{SPM-1}* em 41 isolados (Kalluf et al., 2016). Este gene, amplamente distribuído no Brasil, tem sido encontrado em outros países, tais como Reino Unido, China e Iran, o que indica uma disseminação da resistência (Cai et al.,

2016; Hopkins et al., 2016; Moosavian et al., 2014). Apenas uma amostra de *P. aeruginosa* de nosso estudo apresentou o gene *bla_{IMP}*, contudo, estudos mostram que o mesmo é bastante prevalente em diferentes partes do mundo em amostras desta espécie (Picão et al., 2009; Chen et al., 2014; Fan et al., 2016; Feng et al., 2017; Moosavian et al., 2014).

Ainda na análise dos perfis genéticos de resistência, foi observado que quatro amostras de *P. aeruginosa* não apresentaram nenhum dos genes codificadores de beta-lactamase pesquisados no nosso estudo, porém, as mesmas apresentaram resistência aos carbapenêmicos e outros antimicrobianos testados. Esse achado pode ser explicado pelo fato da resistência aos carbapenêmicos em *P. aeruginosa* poder ter uma origem mediada pela aquisição horizontal de carbapenemases ou cromossômica, por mutações nos genes. Entre os mecanismos mutacionais mais conhecidos em *P. aeruginosa*, destaca-se a repressão ou inativação da *OprD*, uma porina que permite a passagem de carbapenêmicos pela membrana externa da célula bacteriana, conferindo resistência ao imipenem e reduzida sensibilidade ao meropenem (Mushtaq, Livermore, 2004; Juan et al., 2005; Moya et al., 2009).

A tipagem de agentes infecciosos e o estabelecimento do grau de similaridade entre cepas envolvidas em infecções hospitalares permitem a formulação de hipóteses sobre a existência de clones apresentando características especiais de virulência e sobre a transmissão hospitalar desses agentes (Tenover et al., 1997; Olive, Bean, 1999).

Pesquisas de epidemiologia molecular de isolados de *P. aeruginosa* recuperados de infecções hospitalares revelam uma notável diversidade clonal, com a maioria dos isolados representados por pulsotipos diferentes. Além disso, apesar do grande (mais de 2000) e crescente número de STs descritos, a detecção de novas variantes ainda é muito frequente nos estudos mais recentes (Peña et al., 2015).

Em nossa pesquisa, a tipagem molecular das amostras de *P. aeruginosa* realizada por MLST identificou que cada amostra submetida ao sequenciamento apresentou um perfil alélico diferente, sendo encontrado assim um ST para cada amostra (STs 357, 2321, 1121, 244, 227).

Entre os principais clones internacionais de alto risco estão os membros dos complexos clonais (CC): CC111, CC175, CC235, CC244 (Cholley et al., 2014; Peña et al., 2015). Desses, o ST235 é, certamente, aquele que tem a mais ampla distribuição, sendo encontrado em muitos países dos cinco continentes. Além desses clones de alto risco, o CC277 é de particular relevância, sendo prevalente no Brasil e detectado em outros locais (Silva et al., 2011), contudo, nenhuma das amostras que foi analisada em nosso estudo apresentou ST desse complexo.

O ST2321 foi identificado pela primeira vez no Canadá em 2016 e, até o momento, nosso estudo é o segundo relato deste ST. O ST1121 foi identificado pela primeira vez em Taiwan no ano de 2011 e também não há mais relatos encontrados na literatura ou base de dados, sendo nosso estudo o segundo relato do mesmo (<https://pubmlst.org/paeruginosa/>).

O ST357 pertence ao CC357 já foi encontrado em alguns países, tais como a Índia (Pragasam et al., 2016), Reino Unido (Wright et al., 2015), alguns países da Europa Central (Cervená et al. 2011), Japão (Mano et al., 2015) e China (Ji et al. 2013). No Japão, o estudo mostrou que o ST357 carregava o gene *bla_{IMP-1}* e nos países da Europa Central, o gene *bla_{IMP-7}*. Em nosso estudo este ST foi caracterizado por albergar o gene *bla_{VIM}*. O mesmo ocorreu em um estudo realizado no Reino Unido, onde todas as 16 amostras com o ST357 carregavam o gene *bla_{VIM}*. Até o momento, nosso estudo é o primeiro relato deste complexo clonal no Brasil (<https://pubmlst.org/paeruginosa/>).

O ST244 pertence ao CC244, um clone bem disseminado em diversas regiões, identificados em vários países, incluindo a Polônia (Empel et al., 2007), o Brasil (Fonseca et al., 2010), Espanha (Castillo et al., 2011; Viedma et al., 2014), Coreia do Sul (Lee et al., 2011), Bulgária (Vatcheva-Dobrevska et al., 2013), República Checa (Nemec et al., 2010), Grécia (Liakopoulos et al., 2013), Rússia (Edelstein et al., 2013), Líbia (Maatallah et al., 2011), China (Chen et al., 2014), Japão (Mano et al., 2015) e Tanzânia (Moyo et al., 2015). Este ST tem sido reportado por albergar, principalmente, o gene *bla_{VIM-2}* (Viedma et al., 2014; Liakopoulos et al., 2013; Edelstein et al., 2013). Um estudo realizado em 27 hospitais na China, envolvendo 254 isolados de *P. aeruginosa* durante o período de agosto de 2011 e julho de 2012 demonstrou que 233 isolados apresentaram resistência aos carbapenêmicos e através de análises moleculares foram

detectados, mais prevalentemente, os genes *bla*_{IMP}, *bla*_{VIM} e *bla*_{KPC}. Nesse estudo foram encontrados 91 STs entre as amostras, sendo os mais prevalentes: ST292, ST244, ST277, ST235 e ST699 (Fan et al., 2016). Em nossa pesquisa foi observado que a amostra que pertence ao ST244, albergou o gene *bla*_{IMP}. Resultado semelhante foi encontrado na China, onde Chen e colaboradores verificaram que a maioria das amostras que pertenciam ao ST244 carregavam o gene *bla*_{IMP-6} (Chen et al., 2014). Um outro estudo, realizado no Japão, demonstrou que cepas que apresentavam o ST244 carregavam o gene *bla*_{IMP-1} (Mano et al. 2015).

O ST227 pertence ao CC235, um clone de alto risco, presente em diversos países dos cinco continentes e pode albergar variados genes de resistência, como o *bla*_{VIM}, *bla*_{PER}, *bla*_{OXA} (Empel et al., 2007; Feng et al., 2017; Bueno et al., 2017). Estudos na Itália e Grécia, mostraram que cepas com o ST227 albergavam o gene *bla*_{VIM-1} enquanto que na Polônia o gene *bla*_{PER-1} era mais frequente. Resultados distintos foram encontrados em nosso estudo, pois foi observado que as amostras com esse ST apresentavam o gene *bla*_{OXA-1}. Em contraste com alguns estudos que mostram que o gene *bla*_{SPM-1} é, na maioria das vezes, encontrado em cepas com ST277 (Nascimento et al., 2016), nosso estudo verificou que amostras pertencentes ao ST2321 e ST1121 albergavam o gene *bla*_{SPM}.

Através desta análise epidemiológica de nossa pesquisa, foi possível observar que importantes clones de *P. aeruginosa* estão se disseminando cada vez mais e que são necessárias medidas para intervir e prevenir esse fato.

Os resultados obtidos neste estudo mostram a importância da realização de uma vigilância epidemiológica ativa nas instituições de saúde, com o objetivo de detectar e caracterizar isolados clínicos responsáveis por causar as IRAS. Através da mesma pode-se avaliar as características desses micro-organismos quanto ao perfil de resistência aos antimicrobianos, dado importante, pois pode ajudar as instituições a adotarem medidas para melhorar o tratamento dos pacientes, usando uma terapia mais adequada e efetiva. Também auxilia na prevenção da disseminação de clones de importância clínica, contudo, é necessário que os profissionais da saúde se conscientizem para que possa haver

menos disseminação entre hospitais de uma mesma região, evitando, assim, a propagação de micro-organismos multirresistentes na comunidade.

7 CONCLUSÕES

Ao final do presente estudo concluímos que:

- As amostras de *A. baumannii* e *P. aeruginosa* resistentes aos carbapenêmicos circulantes nos hospitais da Grande Vitória apresentam elevado percentual de resistência a grande parte dos antimicrobianos utilizados na prática clínica.
- A resistência às polimixinas observada nas amostras de *A. baumannii* e *P. aeruginosa* é preocupante, tendo em vista que estes antimicrobianos são usados em casos de infecções graves causadas por esses micro-organismos.
- Em *A. baumannii* o gene *bla_{OXA-23}*, mostrou-se prevalente entre os genes codificadores de carbapenemases, perfil semelhante ao que é observado em muitos estudos no Brasil e no Mundo.
- O gene *bla_{VIM}* mostrou-se prevalente entre amostras de *P. aeruginosa* resistentes aos carbapenêmicos em nossa região.
- Mesmo não sendo elevado o número de amostras avaliadas (n=26), houve predomínio de um genótipo (abA) entre as amostras de *A. baumannii*, o que indica a prevalência de um clone circulante na Grande Vitória responsável pelas infecções. Foi possível relatar ainda que amostras deste genótipo pertenciam a fontes de isolamento e hospitais distintos, sugerindo uma disseminação do mesmo entre as diferentes Instituições.
- A origem policlonal das amostras de *P. aeruginosa* confirma a capacidade de diferentes linhagens se disseminarem em hospitais.

- Dois clones internacionais de *P. aeruginosa* de importância mundial foram encontrados em nosso estudo (CC244 e CC235), ressaltando a importância de medidas de controle que evitem sua disseminação.
- Os ST357, ST2321 e ST1121 foram descritos pela primeira vez em *P. aeruginosa* isoladas no Brasil, ressaltando a importância desses resultados.

8 REFERÊNCIAS

AGODI, A. et al. Spread of a carbapenem- and colistin-resistant *Acinetobacter baumannii* ST2 clonal strain causing outbreaks in two Sicilian hospitals. **Journal of Hospital Infection**, v. 86(4), p. 260–266, 2014. Disponível em: <http://doi.org/10.1016/j.jhin.2014.02.001>.

ANTONIO, C. S. et al. High prevalence of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* carrying the bla_{OXA-143} gene in Brazilian hospitals. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 55(3), p. 1322–1323, 2011. Disponível em: <http://doi.org/10.1128/AAC.01102-10>.

BARROS, L. M. et al. Prevalência de micro-organismo e sensibilidade antimicrobiana de infecções hospitalares em unidade de terapia intensiva de hospital público no Brasil. **Revista de Ciências Farmaceuticas Básica e Aplicada**, v. 33(3), p. 429–435, 2012.

BERT, F. et al. Identification of PSE and OXA β -lactamase genes in *Pseudomonas aeruginosa* using PCR–restriction fragment length polymorphism. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 50, p. 11–18, 2002. Disponível em: <http://doi.org/10.1093/jac/dkf069>.

BONNIN, R. A. et al. Carbapenem-hydrolyzing GES-type extended-spectrum β -lactamase in *Acinetobacter baumannii*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 55(1), p. 349–354, 2011. Disponível em : <http://doi.org/10.1128/AAC.00773-10>.

BROWN, S., YOUNG, H. K., AMYES, S. G. B. Characterisation of OXA-51, a novel class D carbapenemase found in genetically unrelated clinical strains of *Acinetobacter baumannii* from Argentina. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 11(1), p. 15–23, 2005. Disponível em: <http://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2004.01016.x>

BUSH, K., FISHER, J. F. Epidemiological expansion, structural studies, and clinical challenges of new beta-lactamases from gram-negative bacteria. **Annual Reviews Microbiology**, v. 65, p. 455–478, 2011. Disponível em: <http://doi.org/10.1146/annurev-micro-090110-102911>

BUSH, K., JACOBY, G. A. Updated functional classification of β -lactamases. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 54(3), p. 969–976, 2010. Disponível em: <http://doi.org/10.1128/AAC.01009-09>.

BUSH, K., JACOBY, G. A., MEDEIROS, A. A. A Functional Classification Scheme for β -Lactamases and Its Correlation with Molecular Structure. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 39(6), p. 1211–1233, 1995.

CARVALHO, A. P. D. et al. Characterization of an epidemic carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* producing SPM-1 metallo-beta-lactamase in a hospital located in Rio de Janeiro, Brazil. **Microbial Drug Resistance**, v. 12(2), p. 103–8, 2006. Disponível em: <http://doi.org/10.1089/mdr>.

CARVALHO, K. R. et al. Dissemination of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* genotypes carrying blaOXA-23 collected from hospitals in Rio de Janeiro, Brazil. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 34(1), p. 25–28, 2009. Disponível em: <http://doi.org/10.1016/j.ijantimicag>.

CHAGAS, T. P. G. et al. Characterization of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* in Brazil (2008-2011): Countrywide spread of OXA-23-producing clones (CC15 and CC79). **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 79(4), p. 468–472, 2014. Disponível em: <http://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio>.

DALLA-COSTA, L. M. et al. Outbreak of Carbapenem-Resistant *Acinetobacter baumannii* Producing the OXA-23 Enzyme in Curitiba, Brazil. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 41(7), p. 3403–3406, 2003. Disponível

em: <http://doi.org/10.1128/JCM.41.7.3403>

DALLENNE, C. et al. Development of a set of multiplex PCR assays for the detection of genes encoding important β -lactamases in Enterobacteriaceae. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 65(3), p. 490–495, 2010. Disponível em: <http://doi.org/10.1093/jac/dkp498>.

DORTET, L., POIREL, L., NORDMANN, P. Worldwide dissemination of the NDM-Type carbapenemases in Gram-negative bacteria. **BioMed Research International**, 2014. Disponível em: <http://doi.org/10.1155/2014/249856>.

DURMAZ, R. et al. The optimization of a rapid pulsed-field gel electrophoresis protocol for the typing of *Acinetobacter baumannii*, *Escherichia coli* and *Klebsiella* spp. **Japanese Journal of Infectious Diseases**, v. 62(5), p. 372–377, 2009.

DZIDIC, S., SUSKOVIC, J., KOS, B. Antibiotic Resistance Mechanisms in Bacteria: Biochemical and Genetic Aspects. **Food Technology and Biotechnology**, v. 46(1), p. 11–21, 2008.

ENOCH, D. A., BIRKETT, C. I., LUDLAM, H. A. Non-fermentative Gram-negative bacteria. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 29(3), p. 33–41, 2007. Disponível em: [http://doi.org/10.1016/S0924-8579\(07\)72176-3](http://doi.org/10.1016/S0924-8579(07)72176-3).

ENOCH, D. A. et al. Investigation and management of an outbreak of multidrug-carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* in Cambridge, UK. **Journal of Hospital Infection**, v. 70(2), p. 109–118, 2008. Disponível em: <http://doi.org/10.1016/j.jhin.2008.05.015>.

FALAGAS, M. E., BLIZIOTIS, I. A., SIEMPOS, I. I. Attributable mortality of *Acinetobacter baumannii* infections in critically ill patients: a systematic review of matched cohort and case-control studies. **Critical Care (London,**

England), v. 10(2), p. 48, 2006. Disponível em: <http://doi.org/10.1186/cc4869>.

FAN, X. et al. Diverse Genetic Background of Multidrug-Resistant *Pseudomonas aeruginosa* from Mainland China, and Emergence of an Extensively Drug-Resistant ST292 Clone in Kunming. **Scientific Reports**, 2016. Disponível em: <http://doi.org/10.1038/srep26522>.

GADDY, J. A., TOMARAS, A. P., ACTIS, L. A. The *Acinetobacter baumannii* 19606 OmpA protein plays a role in biofilm formation on abiotic surfaces and in the interaction of this pathogen with eukaryotic cells. **Infection and Immunity**, v. 77(8), p. 3150–3160, 2009. Disponível em: <http://doi.org/10.1128/IAI.00096-09>.

GALES, A. C. et al. Antimicrobial resistance among Gram-negative bacilli isolated from Latin America: Results from SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (Latin America, 2008-2010). **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 73(4), p. 354–360, 2012. Disponível em: <http://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2012.04.007>

GAN, H. M. et al. Genome sequence of *Acinetobacter baumannii* AC12, a polymyxin-resistant strain isolated from Terengganu, Malaysia. **Journal of Bacteriology**, v. 194(21), p. 5979–5980, 2012. Disponível em: <http://doi.org/10.1128/JB.01466-12>

GARCIA, L. M. et al. Perfil epidemiológico das infecções hospitalares por bactérias multidroga-resistentes em um hospital do norte de Minas Gerais. **Revista de Epidemiologia e Controle de Infecção**, v. 3(2), p. 45–49, 2013.

GERNER-SMIDT, P. Ribotyping of the *Acinetobacter calcoaceticus*-*Acinetobacter baumannii* complex. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 30(10), p. 2680–2685, 1992.

IACONO, M. et al. Whole-genome pyrosequencing of an epidemic multidrug-

resistant *Acinetobacter baumannii* strain belonging to the European clone II group. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 52(7), p. 2616–2625, 2008. Disponível em: <http://doi.org/10.1128/AAC.01643-07>.

JUAN, C. et al. Molecular Mechanisms of β -Lactam Resistance Mediated by AmpC Hyperproduction in *Pseudomonas aeruginosa* Clinical Strains. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 49(11), p. 4733–4738, 2005. Disponível em: <http://doi.org/10.1128/AAC.49.11.4733>.

KARAH, N. et al. Insights into the global molecular epidemiology of carbapenem non-susceptible clones of *Acinetobacter baumannii*. **Drug Resistance Updates**, v. 15(4), p. 237–247, 2012. Disponível em: <http://doi.org/10.1016/j.drug.2012.06.001>.

KHORSI, K. et al. High prevalence of multidrug-resistance in *Acinetobacter baumannii* and dissemination of carbapenemase-encoding genes blaOXA-23-like, blaOXA-24-like and blaNDM-1 in Algiers hospitals. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, v. 8(6), p. 438–46, 2015. Disponível em: <http://doi.org/10.1016/j.apjtm.2015.05.011>.

LEE, H. et al. Capacity of multidrug-resistant clinical isolates of *Acinetobacter baumannii* to form biofilm and adhere to epithelial cell surfaces. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 14(1), p. 49–54, 2008. Disponível em: <http://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2007.01842.x>.

LIMA, M. E., ANDRADE, D. DE, HAAS, V. J. Avaliação prospectiva da ocorrência de infecção em pacientes críticos de unidade de terapia intensiva. **Revista Brasileira de Terapia Intensiva**, v. 19(3), p. 342–347, 2007.

LIVERMORE, D. M. Of *Pseudomonas*, porins, pumps and carbapenems. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 47(3), p. 247–250, 2001. Disponível em: <http://doi.org/10.1093/jac/47.3.247>

LOEHFELM, T. W., LUKE, N. R., CAMPAGNARI, A. A. Identification and characterization of an *Acinetobacter baumannii* biofilm-associated protein. **Journal of Bacteriology**, v. 190(3), p. 1036–1044, 2008. Disponível em: <http://doi.org/10.1128/JB.01416-07>

LUCENA, A. et al. Nosocomial infections with metallo-beta-lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa*: Molecular epidemiology, risk factors, clinical features and outcomes. **Journal of Hospital Infection**, v. 87(4), p. 234–240, 2014. Disponível em: <http://doi.org/10.1016/j.jhin.2014.05.007>.

MARTÍNEZ-LAMAS, L. et al. Nuevo clon de *Acinetobacter baumannii* ST187 responsable de un brote en una unidad de cuidados intensivos. **Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica**, v. 32(4), p. 242–245, 2016.

MARTINS, P. Epidemiologia das infecções hospitalares em centro de terapia intensiva de adulto. 2006. 97 f. Dissertação (Mestrado em Medicina tropical) - Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

MCGOWAN, J. E. Resistance in nonfermenting gram-negative bacteria: Multidrug resistance to the maximum. **American Journal of Infection Control**, v. 34(5), p. 29-37, 2006. Disponível em: <http://doi.org/10.1016/j.ajic>.

MOURA, M. E. B. et al. Infecção hospitalar: Estudo de prevalência em um hospital público de ensino. **Revista Brasileira de Enfermagem**, v. 60(4), p. 416–421, 2007. Disponível em: <http://doi.org/10.1590/S0034-1672007000400011>.

MOYA, B. et al. β -Lactam Resistance Response Triggered By Inactivation of a Nonessential Penicillin-Binding Protein. **PLoS Pathogens**, v. 5(3), 2009. Disponível em: <http://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000353>.

MUSHTAQ, S., GE, Y., LIVERMORE, D. M. Doripenem versus *Pseudomonas aeruginosa* In Vitro : Activity against Characterized Isolates , Mutants , and Transconjugants and Resistance Selection Potential. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 48(8), p. 3086–3092, 2004. Disponível em: <http://doi.org/10.1128/AAC.48.8.3086>.

NEMEC, A. et al. Genotypic and phenotypic characterization of the *Acinetobacter calcoaceticus*-*Acinetobacter baumannii* complex with the proposal of *Acinetobacter pittii* sp. nov. (formerly *Acinetobacter genomic species 3*) and *Acinetobacter nosocomialis* sp. nov. **Research in Microbiology**, v. 162(4), p. 393–404, 2011. Disponível em: <http://doi.org/10.1016/j.resmic.2011.02.006>.

NEYESTANAKI, D. K. et al. Determination of extended spectrum beta-lactamases, metallo-beta-lactamases and AmpC-beta-lactamases among carbapenem resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolated from burn patients. **Burns**, v. 40(8), p. 1556–1561, 2014. Disponível em: <http://doi.org/10.1016/j.burns.2014.02.010>.

NUCLEO, E. et al. Growth in glucose-based medium and exposure to subinhibitory concentrations of imipenem induce biofilm formation in a multidrug-resistant clinical isolate of *Acinetobacter baumannii*. **BMC Microbiology**, 2009. Disponível em: <http://doi.org/10.1186/1471-2180-9-270>.

OPAZO, A. et al. (2012). OXA-type carbapenemases in *Acinetobacter baumannii* in South America. **Journal of Infection in Developing Countries**, v. 6(4), v. 311–316, 2012. Disponível em: <http://doi.org/10.3855/jidc.2310>.

PAPP-WALLACE, K. M. et al. Carbapenems: Past, present, and future. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 55(11), p. 4943–4960, 2011. Disponível em: <http://doi.org/10.1128/AAC.00296-11>.

PATERSON, D. L., BONOMO, R. A. Extended-Spectrum β -Lactamases : a

Clinical Update. *Clinical Microbiology Reviews* , v. 18(4), p. 657–686, 2005. Disponível em: <http://doi.org/10.1128/CMR.18.4.657>.

PAUL, D. et al. Occurrence of co-existing bla VIM-2 and bla NDM-1 in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* from India. **Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials**, v. 15(1), p. 31, 2016. Disponível em: <http://doi.org/10.1186/s12941-016-0146-0>.

PELEG, A. Y., SEIFERT, H., PATERSON, D. L. (2008). *Acinetobacter baumannii*: Emergence of a successful pathogen. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 21(3), p. 538–582, 2008. Disponível em: <http://doi.org/10.1128/CMR.00058-07>.

PICÃO, R. C. et al. Metallo- β -lactamase detection: Comparative evaluation of double-disk synergy versus combined disk tests for IMP-, GIM-, SIM-, SPM-, or VIM-producing isolates. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 46(6), p. 2028–2037, 2008. Disponível em: <http://doi.org/10.1128/JCM.00818-07>.

POIREL, L., NAAS, T., NORDMANN, P. (2010). Diversity, epidemiology, and genetics of class D β -lactamases. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 54(1), p. 24–38, 2010. Disponível em: <http://doi.org/10.1128/AAC.01512-08>.

POIREL, L. et al. Multiplex PCR for detection of acquired carbapenemase genes. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 70(1), p. 119–123, 2011. Disponível em: <http://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio>.

QUALE, J. et al. Molecular epidemiology and mechanisms of carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii* endemic in New York City. **Clinical Infectious Diseases**, v. 37(2), p. 214–220, 2003. Disponível em: <http://doi.org/10.1086/375821>.

QUEENAN, A. M., BUSH, K. Carbapenemases: The versatile β -lactamases.

Clinical Microbiology Reviews, v. 20(3), p. 440–458, 2007. Disponível em: <http://doi.org/10.1128/CMR.00001-07>.

RAMOUL, A. et al. Co-occurrence of blaNDM-1 with blaOXA-23 or blaOXA-58 in clinical multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* isolates in Algeria. **Journal of Global Antimicrobial Resistance**, v. 6, p. 136–141, 2016. Disponível em: <http://doi.org/10.1016/j.jgar.2016.05.003>.

RAO, R. S. et al. Correlation between biofilm production and multiple drug resistance in imipenem resistant clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. **Indian Journal of Medical Microbiology**, v. 26(4), p. 333–337, 2008. Disponível em: <http://doi.org/10.4103/0255-0857.43566>.

SADER, H. S. et al. Epidemiologic typing of multiply drug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolated from an outbreak in an intensive care unit. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 17(1), p. 13–18, 1993. Disponível em: [http://doi.org/10.1016/0732-8893\(93\)90063-D](http://doi.org/10.1016/0732-8893(93)90063-D).

SANTOS, N. Q. A resistência bacteriana no contexto da infecção hospitalar. **Texto & Contexto - Enfermagem**, v. 13, p. 64–70, 2004. Disponível em: <http://doi.org/10.1590/S0104-07072004000500007>.

SINGH, A. Application of molecular techniques to the study of hospital infection. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 19(3), p. 512–530, 2006. Disponível em: <http://doi.org/10.1128/CMR.00025-05>

SMANI, Y. et al. *Acinetobacter baumannii*-induced lung cell death: Role of inflammation, oxidative stress and cytosolic calcium. **Microbial Pathogenesis**, v. 50(5), p. 224–232, 2011. Disponível em: <http://doi.org/10.1016/j.micpath.2011.01.008>

SMANI, Y., MCCONNELL, M. J., PACHÓN, J. Role of fibronectin in the adhesion of *Acinetobacter baumannii* to host cells. **PLoS One**, v. 7(4), 2012.

Disponível em: <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0033073>.

SOHRABI, N. et al. Prevalence of OXA-type β -lactamases among *Acinetobacter baumannii* isolates from Northwest of Iran. **Microbial drug resistance**, v. 18(4), 2012.

SUÁREZ, C.; GUDIOL, F. Antibióticos betalactámicos. **Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica**, v. 27(2), p. 116–129, 2009.

TENOVER, F. C. Mechanisms of antimicrobial resistance in bacteria. **American Journal of Infection Control**, v. 34(5), 2006.

TIWARI, V. et al. Comparative proteomics of inner membrane fraction from Carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* with a reference strain. **PLoS ONE**, v. 7(6), 2012.

TOMARAS, A. P. et al. Attachment to and biofilm formation on abiotic surfaces by *Acinetobacter baumannii*: Involvement of a novel chaperone-usher pili assembly system. **Microbiology**, v. 149(12), p. 3473–3484, 2003.

TOWNER, K. J. *Acinetobacter* spp. as nosocomial pathogens: microbiological, clinical, and epidemiological features. *Acinetobacter* spp. as Nosocomial Pathogens: Microbiological, Clinical, and Epidemiological Features. v. 9(2), p. 148–165, 1996.

TOGNIM, M. C. B. et al. Resistance trends of *Acinetobacter* spp. in Latin America and characterization of international dissemination of multi-drug resistant strains: Five-year report of the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 8(5), p. 284–291, 2004. Disponível em : <http://doi.org/10.1016/j.ijid.2003.11.009>.

VASCONCELOS, A. T. R. et al. The changing epidemiology of *Acinetobacter* spp. producing OXA carbapenemases causing bloodstream infections in Brazil: A BrasNet report. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 83(4), p. 382–385, 2015.

WITNEY, A. et al. Genome sequencing and characterization of an extensively drug-resistant sequence type 111 serotype O12 hospital outbreak strain of *Pseudomonas aeruginosa*. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 20(10), p. 609-618, 2014.

WOODFORD, N. et al. Multiplex PCR for genes encoding prevalent OXA carbapenemases in *Acinetobacter* spp. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 27, p. 351–353, 2006.

ZAFER, M. M. et al. First report of NDM-1-producing *Pseudomonas aeruginosa* in Egypt. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 29, p. 80-81, 2014.